

538,305

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年6月24日 (24.06.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/053498 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/68, 27/62, 27/447
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/015522
- (22) 国際出願日: 2003年12月4日 (04.12.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2002-357972
2002年12月10日 (10.12.2002) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 日本電気株式会社 (NEC CORPORATION) [JP/JP]; 〒108-8001

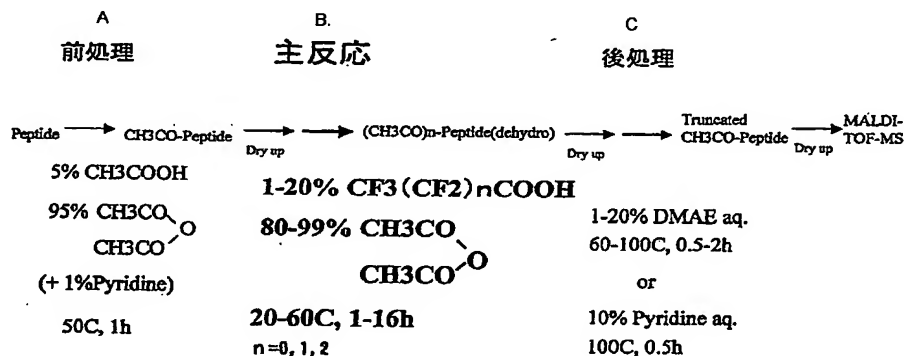
東京都港区芝五丁目7番1号 Tokyo (JP). 東京理化学株式会社 (TOKYO RIKAKIKAI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町3丁目3番4号 Tokyo (JP).

- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 宮崎 賢司 (MIYAZAKI, Kenji) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 次田 皓 (TSUGITA, Akira) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 上條 憲一 (KAMIJO, Kenichi) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 鍋谷 卓司 (NABETANI, Takuji) [JP/JP]; 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町3丁目3番4号 東京理化学株式会社内 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF ANALYZING C-TERMINAL AMINO ACID SEQUENCE OF PEPTIDE

(54) 発明の名称: ペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法



A...PRETREATMENT
B...MAIN REACTION
C...POSTTREATMENT

(57) **Abstract:** It is intended to provide a method of analyzing the C-terminal amino acid sequence of a peptide with the use of a means of successively degrading C-terminal amino acids whereby the C-terminal amino acids of a peptide having a long amino acid chain can be successively degraded while preventing undesirable side-reactions such as cleavage of a peptide chain in the middle of the peptide and the treatment can be carried out under widely applicable conditions. Namely, a method of specifying the C-terminal amino acid sequence by preliminarily N-acylating a dry sample of a peptide having a long amino acid chain, successively degrading the C-terminal amino acids under mild conditions by using a reaction reagent comprising an alkanolic acid anhydride combined with a small amount of a perfluoroalkanoic acid, hydrolyzing, then digesting the obtained product with trypsin to thereby selectively fractionate it at an arginine site, and then measuring a molecular weight loss of the C-terminal fragment caused by a series of the reaction products by the negative mode analysis with the use of an MALDI-TOF-MS apparatus.

(57) 要約: 本発明は、アミノ酸長の長いペプチドのC末端アミノ酸を逐次的に分解する際、ペプチド途中におけるペプチド結合の切断などの好ましくない副次反応を抑制でき、その処理を汎用性の富む条件で実施することが可能な、逐次的C末端アミノ酸の分解反応手段を利用した

[続葉有]

WO 2004/053498 A1



(74) 代理人: 宮崎 昭夫, 外(MIYAZAKI, Teruo et al.); 〒
107-0052 東京都 港区 赤坂 1 丁目 9 番 2 0 号 第 1 6 興
和ビル 8 階 Tokyo (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(81) 指定国 (国内): AU, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

ペプチドの C 末端アミノ酸配列解析方法として、アミノ酸長の長いペプチドの乾燥試料に対して、予め N-アシル
化処理を施し、アルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸少量とを組み合わせた反応試薬を利用し、穏和な条件
で C 末端アミノ酸の逐次的分解を行い、加水処理後、トリプシン消化により、アルギニン残基部位で選択的に断片
化を行い、MALDI-TOF-MS 装置のネガティブ・モード解析により、一連の反応産物に由来する C 末側断片
の分子量減少を測定し、C 末端アミノ酸配列を特定する方法を提供する。

明 細 書

ペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法

技術分野

- 5 本発明は、ペプチドのC末端アミノ酸配列を解析する方法に関し、より具体的には、ペプチド、例えば、タンパク質などのアミノ酸残基数の多いペプチドに関して、化学的方法により該ペプチドのC末端アミノ酸を逐次的に分解して、その反応産物の分子量を質量分析により決定し、逐次的に除去される一連のアミノ酸に起因する分子量減少に基づき、C末端アミノ酸配列を解明する方法に
- 10 関する。

背景技術

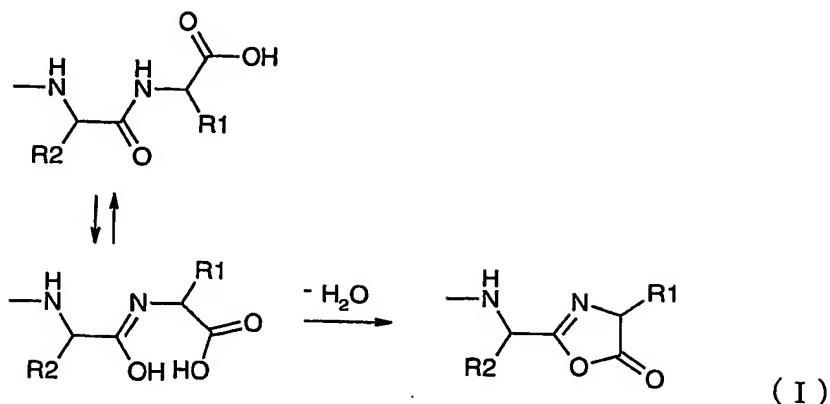
- 天然より採取されるペプチドやタンパク質に関して、そのアミノ酸配列の同定は、かかるペプチドやタンパク質の生物学的性質、機能を研究する際、不可
- 15 欠な情報である。現在、ペプチドやタンパク質の全アミノ酸配列は、対応する遺伝子情報、すなわち、これらのペプチドをコードしているゲノム遺伝子やm-RNAより調製されたc-DNAの塩基配列に基づき、推断されるアミノ酸配列として決定されている。その際、該ペプチドをコードしているゲノム遺伝子やm-RNAより調製されたc-DNAを特定する上では、ペプチドの部分
- 20 的なアミノ酸配列の知見は、依然として必要である。

- このペプチドの部分的なアミノ酸配列の知見としては、一般に、ペプチドのN末端アミノ酸配列とC末端アミノ酸配列とが、特に有用とされている。具体的には、例えば、多数のm-RNAより調製されたc-DNAライブラリーから、目的とするペプチドをコードしているc-DNAを選別する際、仮に、N
- 25 末端アミノ酸配列とC末端アミノ酸配列とが判明していると、かかる両末端のアミノ酸配列に基づき、作製された核酸プローブを利用して、目標とするc-DNAを選別することが可能となる。あるいは、両末端のアミノ酸配列に基づき作製されたオリゴヌクレオチド・プライマーを利用して、PCR法を適用し

て、目標とする c-DNA を選択的に増幅することも可能となる。

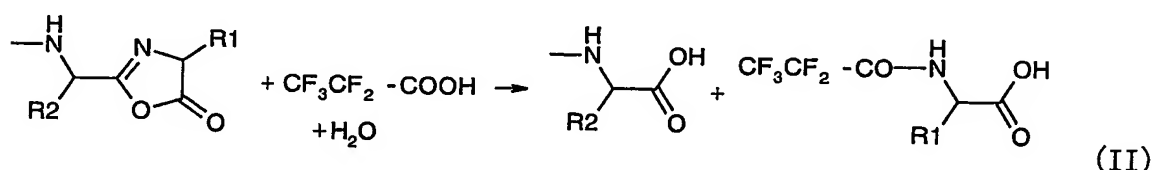
ペプチドの N 末端アミノ酸配列を解析する手法としては、従来から、エドマン分解法を利用して、N 末端アミノ酸を逐次的に分解しつつ、生成するアミノ酸誘導体を同定する手法が利用されている。一方、ペプチドの C 末端アミノ酸配列を解析する手段として、化学的手法により C 末端アミノ酸を逐次的に分解し、その反応産物として得られる短縮されたペプチドと元のペプチドとの分子量差から、分解された C 末端アミノ酸を特定する方法が既に提案されている。例えば、化学的手法により C 末端アミノ酸を逐次的に分解する手段として、90°C に加熱しつつ、乾燥したペプチドにペンタフルオロプロパン酸 ($\text{CF}_3\text{CF}_2\text{COOH}$) 高濃度水溶液、あるいは、ヘプタフルオロブタン酸 ($\text{CF}_3\text{CF}_2\text{CF}_2\text{COOH}$) 高濃度水溶液から発生した蒸気を作用させて、前記パーフルオロアルカン酸により促進される、C 末端アミノ酸の選択的な加水分解を行わせる方法が提案されている (Tsugita, A. et al., Eur. J. Biochem. 206, 691-696 (1992))。加えて、前記パーフルオロアルカン酸高濃度水溶液に代えて、無水ペンタフルオロプロパン酸 ($(\text{CF}_3\text{CF}_2\text{CO})_2\text{O}$) のアセトニトリル溶液、または無水ヘプタフルオロブタン酸 ($(\text{CF}_3\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CO})_2\text{O}$) のアセトニトリル溶液を用いて、例えば、-18°C に冷却しつつ、この溶液から発生した蒸気を乾燥したペプチドに作用させて、前記パーフルオロアルカン酸無水物により促進される、C 末端アミノ酸の選択的な分解を行わせる方法が提案されている (Tsugita, A. et al., Chem. Lett. 1992, 235-238; Takamoto K. et al., Eur. J. Biochem. 228, 362-372 (1995))。

前記の乾燥したペプチドに、蒸気として供給されるパーフルオロアルカン酸、あるいは、パーフルオロアルカン酸無水物を作用させ、C 末端アミノ酸の選択的な分解を行う手法では、下記する反応式 (I) で表記される脱水反応：



により、C末端アミノ酸から反応中間体として、オキサゾロン環構造が一端形成され、次いで、パーフルオロアルカン酸がこのオキサゾロン環に作用し、次に示す反応式 (II) で表記される反応：

5



が生じ、結果的に、C末端アミノ酸の選択的な分解反応が達成されると報告されている。

上記のC末端アミノ酸の選択的な分解反応は逐次的に進み、所定の処理時間が経過した時点で、元のペプチドに対して、1～10数アミノ酸残基がそのC末端からそれぞれ除去された一連の反応産物を含む混合物が得られる。この一連の反応産物を含む混合物に対して、質量分析法を適用して、各反応産物に由来するイオン種の質量を測定すると、C末端アミノ酸配列を反映した質量差を示す一連のピークが測定できる。具体的には、各反応産物は、元のペプチドから逐次的なC末端アミノ酸分解反応で生成される結果、例えば、元のペプチドから数アミノ酸残基が除去された反応産物までの、数種の一連の反応産物群に関して、質量分析法を利用することで、対応するイオン種の質量を一括して分析することができ、かかる数アミノ酸残基分のC末端アミノ酸配列を一括して決定できる。

20 なお、例えば、核酸プローブやプライマーの作製に利用するC末端アミノ酸

配列の情報は、通常、かかるアミノ酸配列をコードする塩基配列として、18塩基長～24塩基長程度、従って、6アミノ酸～8アミノ酸程度であってもよく、10数アミノ酸残基に達するC末端アミノ酸配列の解明を必要とするのは、極めて特殊な場合のみである。従って、上記のパーフルオロアルカン酸または

5 パーフルオロアルカン酸無水物の蒸気を気相から供給しつつ、乾燥したペプチドに作用させて、逐次的なC末端アミノ酸分解反応により、例えば、10アミノ酸残基の除去に達する一連の反応産物を同時に含有する処理試料を調製するこれらの手段は、前記の用途に適合したものである。

10

発明の開示

一方、解析対象のペプチドが、例えば、タンパク質などのアミノ酸残基数の多いペプチドである場合には、元のペプチド自体の分子量が、質量分析法の適用可能な分子量範囲を超える、あるいは、元のペプチド自体の大きな分子量に対して、1アミノ酸残基の式量変化が相対的に少なく、分子量差の測定精度の低下を起こすため、下記の工夫が検討されている。具体的には、上記のC末端

15 アミノ酸の選択的な分解反応で得られる、元のペプチドに対して、1～10数アミノ酸残基がそのC末端からそれぞれ除去された一連の反応産物を含む混合物に対して、特定のアミノ酸部位において、選択的なペプチド鎖の切断が可能な、切断部位特異性を有するプロテアーゼ、例えば、トリプシンを利用し、長

20 いペプチド鎖の酵素消化を施した上で、そのペプチド断片について、質量分析を行う形態を利用している。すなわち、かかる酵素消化を施して得られるペプチド断片の混合物中には、元のペプチドに由来するC末側ペプチド断片と、それに対して、1～10数アミノ酸残基がそのC末端からそれぞれ除去された一連の反応産物に由来するC末側ペプチド断片群が含まれており、この元のペプ

25 チド、ならびに一連の反応産物に由来するC末側ペプチド断片群に対して、質量分析法を適用して、各反応産物に由来するC末側ペプチド断片群イオン種の質量を測定すると、C末端アミノ酸配列を反映した質量差を示す一連のピークを、十分な分子量分解能で測定できる。

それに対して、上述のパーフルオロアルカン酸またはパーフルオロアルカン酸無水物の蒸気を気相から供給しつつ、乾燥したペプチドに作用させる手法は、有用なC末端アミノ酸配列の解明手段ではあるものの、解析対象のペプチドが、例えば、タンパク質などのアミノ酸残基数の多いペプチドである場合に、汎用の手段として利用を進める際、以下に記載する幾つか実用上の課題を残すことが判明した。

第一の課題としては、上述するパーフルオロアルカン酸高濃度水溶液を利用し、例えば、90℃に加熱しつつ、乾燥したペプチドにパーフルオロアルカン酸蒸気を作用させる手法では、ペプチド中のセリン残基 ($\text{—NH—CH(CH}_2\text{OH)—CO—}$) において、 α 位のアミノ基 (—NH—) と β 位のヒドロキシ基 (—OH) の間で、N, O-アシル転位反応も進行し、引き続き、加水分解が進行し、セリン残基のN末側でペプチドの切断が生じるという副反応が存在する。また、条件によっては、 β 位にヒドロキシ基 (—OH) が存在しているトレオニン残基 ($\text{—NH—CH(CH(CH}_3\text{)OH)—CO—}$) においても、同様の機構による加水分解が進行し、トレオニン残基のN末側でペプチドの切断が生じるという副反応が存在する。さらには、ペプチド中のアスパラギン酸残基 ($\text{—NH—CH(CH}_2\text{COOH)—CO—}$) において、C末のカルボキシ基から β 位のカルボキシ基へのペプチド結合の転位と、それに引き続く加水分解が進行し、アスパラギン酸残基のC末側でペプチドの切断が生じるという副反応が存在する。

これら副次反応により、長いペプチド鎖の切断が生じると、そのN末側ペプチド断片に対しても、C末端アミノ酸の選択的な分解が同時に進行することになる。これらの副次反応に由来する反応産物が共存すると、場合によっては、目的とする反応産物の質量分析に際して、その測定を阻害する要因ともなる。

さらには、元のペプチド鎖の切断に至らなくとも、 β 位のヒドロキシ基 (—OH) へN末側部分ペプチドが連結された分岐型ペプチドとなると、その部位では、アミド結合が失われており、オキサゾロン環構造の形成がなされず、C末端アミノ酸の選択的な分解反応がそれ以上進行しないものとなる。

それに対して、上述するパーフルオロアルカン酸無水物のアセトニトリル溶液を利用し、例えば、 -18°C に冷却しつつ、この溶液から発生したパーフルオロアルカン酸無水物蒸気を乾燥したペプチドに作用させる手法は、系内に溶液から蒸発する水分子を含まないので、前記の副次的反応の発生を有効に回避
5 できる利点を有している。ただし、利用しているパーフルオロアルカン酸無水物の反応性が高く、処理温度が上昇すると、不要な副次的反応を効果的に抑制することが困難となるため、処理温度を、例えば、 -18°C のような低温に維持する必要がある。換言すれば、処理温度の調整が不十分であると、不要な副
10 反応が進行する可能性が高く、その観点では、汎用性になお難点を残し、更なる改良の余地を有する手法ともいえる。加えて、冷却に伴って水分の結露を起こすと、かかる水分により、利用している試薬の劣化、すなわち、パーフルオロアルカン酸無水物の劣化が起こり、結果として、反応性の低下を引き起こすこともあり、実用上の問題になる懸念もある。

第二の課題としては、解析対象のペプチドが、例えば、タンパク質などのア
15 ミノ酸残基数の多いペプチドである場合には、C末端アミノ酸の選択的な分解反応を行った後、切断部位特異性を有するプロテアーゼを利用する酵素消化処理を付加し、得られるC末側ペプチド断片の分子量測定を行う形態を採用することが検討されているが、その際、かかる酵素消化で必然的に副生される、N
20 末側のペプチド断片複数も、測定される質量分析スペクトル上に、同時に観測されることになる。すなわち、元のペプチド、ならびに一連の反応産物に由来するC末側ペプチド断片群に起因するピークと、それ以外のN末側のペプチド断片複数に起因するピークとを高い確度で分別した上で、目的とする、元のペ
25 プチド、ならびに一連の反応産物に由来するC末側ペプチド断片群に起因するピークの各分子量をより精度よく決定可能な、測定手法の提案が待たれている。

本発明は前記の課題を解決するもので、本発明の目的は、上述する長いペ
チド鎖のC末端アミノ酸を、オキサゾロン環構造の形成を経由する反応機構を利用して、逐次的に分解する際、ペプチド鎖途中におけるペプチド結合の断裂
などの好ましくない副次反応を抑制でき、同時にかかる化学的な処理自体は、

汎用性の富む条件で実施することが可能な、逐次的C末端アミノ酸の分解反応手段を提供するとともに、元のペプチド、ならびに調製される一連の反応産物を、切断部位特異性を有するプロテアーゼを利用する酵素消化処理を行った後、これら酵素消化ペプチド断片複数を質量分析する際、目的とする、元のペプチド、ならびに一連の反応産物に由来するC末側ペプチド断片群に起因するピークと、その他の酵素消化ペプチド断片複수에起因するピークとの弁別をより容易とするプロテアーゼを利用する酵素消化処理と、前記逐次的C末端アミノ酸の分解反応手段とを組み合わせ、長いペプチド鎖のC末端アミノ酸配列をより簡便に解析可能な方法を提供することにある。

10

本発明者らは、上記の課題を解決すべく、鋭意検討と研究を繰り返したところ、パーフルオロアルカン酸高濃度水溶液を利用し、例えば、90℃に加熱しつつ、乾燥したペプチドにパーフルオロアルカン酸蒸気を作用させる手法における不要な副次的反応は、系内にパーフルオロアルカン酸高濃度水溶液から蒸発する、パーフルオロアルカン酸と水分子が存在するため、例えば、ペプチド中のセリン残基($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-\text{CO}-$)において、 α 位のアミノ基($-\text{NH}-$)と β 位のヒドロキシ基($-\text{OH}$)の間で、N, O-アシル転位反応が前記加熱条件下で促進を受け、さらに、生成するエステルの加水分解も系内に存在する水分子により促進を受ける結果と結論された。一方、パーフルオロアルカン酸無水物のアセトニトリル溶液を利用し、例えば、 -18°C に冷却しつつ、乾燥したペプチドにパーフルオロアルカン酸無水物蒸気を作用させる手法では、系内に水分子は存在しないものの、パーフルオロアルカン酸無水物自体の高い反応性に起因して、処理温度の上昇とともに、不要な副次的反応の頻度が急速に増すことが確認されている。

25

以上の知見に基づき、本発明者らは、系内への水分子の供給源となる水溶媒を使用することなく、また、パーフルオロアルカン酸無水物の如く、高い反応性を示す試薬を使用することなく、C末端アミノ酸から反応中間体として、オキサゾロン環構造を形成し、引き続き、このオキサゾロン環の開裂に伴う、C

末端アミノ酸の選択的な分解反応を行うことが可能な反応条件を探索したところ、少量のパーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に添加した混合物を利用して、例えば、気相から、この混合物から供給される、蒸気状のパーフルオロアルカン酸とアルカン酸無水物とを乾燥したペプチドに作用させると、例えば、60℃以下の処理温度においても、オキサゾロン環構造の形成、引き続き、このオキサゾロン環の開裂に伴う、C末端アミノ酸の選択的な分解反応が進行することを見出した。加えて、アルカン酸無水物は、パーフルオロアルカン酸無水物と比較し、その反応性は大幅に穏やかであり、パーフルオロアルカン酸共存下においても、ペプチドの途中切断を引き起こすには至らないことを見出した。具体的には、ペプチド中のセリン残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-\text{CO}-$) やトレオニン残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH})-\text{CO}-$) に存在するヒドロキシ基に対して、パーフルオロアルカン酸の共存下、アルカン酸無水物が作用して、O-アシル化反応が優先的に進行し、N, O-アシル転位反応を競争的に阻害する。同時に、N末端のアミノ基へのN-アシル化反応が進行し、また、リシン残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)-\text{CO}-$) のε位のアミノ基へのN-アシル化反応、チロシン残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH})-\text{CO}-$) のフェノール性ヒドロキシ基へのO-アシル化反応なども進行することも判明した。結果的に、ペプチドの途中切断を誘起する、N, O-アシル転位反応等の転位反応に関与する側鎖上のヒドロキシ基、アミノ基などの反応性官能基は、保護・修飾を受けるため、不要な副反応は回避しつつ、目的とするC末端アミノ酸から反応中間体として、オキサゾロン環構造を形成し、引き続き、このオキサゾロン環の開裂に伴う、C末端アミノ酸の分解反応のみが、例えば、60℃以下の処理温度において選択的に進行することを見出した。

加えて、本発明者らは、上記のパーフルオロアルカン酸とアルカン酸無水物とを利用する、オキサゾロン環構造の形成、引き続き、このオキサゾロン環の開裂に伴う、C末端アミノ酸の選択的な分解反応は、系内に水分子が存在しない状態とし、双極性非プロトン性溶媒中にパーフルオロアルカン酸とアルカン

- 酸無水物とを溶解させて、対象となるペプチドに液相で作用させた場合も、例えば、40℃程度の処理温度においても、オキサゾロン環構造の形成、引き続き、このオキサゾロン環の開裂に伴う、C末端アミノ酸の選択的な分解反応が進行することを見出した。加えて、ヒドロキシ基に対して、パーフルオロアル
- 5 カン酸の共存下、アルカン酸無水物が作用して、O-アシル化反応が優先的に進行し、N, O-アシル転位反応を競争的に阻害する効果、ならびに、アミノ基へのN-アシル化反応、フェノール性ヒドロキシ基へのO-アシル化反応なども進行することも判明した。結果的に、ペプチドの途中切断を誘起する、N, O-アシル転位反応等の転位反応に関与する側鎖上のヒドロキシ基、アミノ基
- 10 などの反応性官能基は、保護・修飾を受けるため、不要な副次反応は回避しつつ、目的とするC末端アミノ酸から反応中間体として、オキサゾロン環構造を形成し、引き続き、このオキサゾロン環の開裂に伴う、C末端アミノ酸の分解反応のみが、例えば、40℃以下の処理温度においても、選択的に進行することを見出した。例えば、ゲル電気泳動後、かかるゲル担体上に担持されている
- 15 ペプチドであっても、予め、ゲル担体中に含浸される水分を十分に除去する脱水処理を施した後、双極性非プロトン性溶媒中にパーフルオロアルカン酸とアルカン酸無水物とを溶解させてなる溶液を、ゲル担体内に浸入させ、ゲルの膨潤を図ると、ゲル担体中においても、同等の液相反応を達成できることを見出した。
- 20 加えて、本発明者らは、ヒドロキシ基に対するO-アシル化、アミノ基へのN-アシル化による、ペプチドの途中切断を誘起する、N, O-アシル転位反応等の転位反応に関与する側鎖上のヒドロキシ基、アミノ基などの反応性官能基の保護・修飾を予め施した後、上記のパーフルオロアルカン酸とアルカン酸無水物とを利用する、オキサゾロン環構造の形成、引き続き、このオキサゾ
- 25 ン環の開裂に伴う、C末端アミノ酸の選択的な分解反応を実施すると、不要な副次反応の回避には、より有効であることを確認した。具体的には、ペプチドの乾燥試料に対して、乾燥雰囲気下、10℃～60℃の範囲に選択される温度において、アルカン酸無水物にアルカン酸を少量添加してなる混合物より供給

される、蒸気状のアルカン酸無水物とアルカン酸とを作用させると、該ペプチ
ドN末端のアミノ基ならびに、該ペプチドに含有されている可能性のあるリシ
ン残基側鎖のアミノ基に対して、前記アルカン酸無水物由来のアシル基による
N-アシル化、ならびに、側鎖上のヒドロキシ基に対するO-アシル化を予め
5 施すことが可能であることを見出した。また、ゲル担体上に担持されているペ
プチドであっても、予め、ゲル担体中に含浸される水分を十分に除去する脱水
処理を施した後、双極性非プロトン性溶媒中にアルカン酸無水物を溶解させて
なる溶液を、ゲル担体内に浸入させ、ゲルの膨潤を図ると、ゲル担体中におい
ても、同等の液相でのN-アシル化、O-アシル化反応を行わせることが可能
10 であることを見出した。

また、本発明者らは、上述のC末端アミノ酸の分解反応を終えた時点では、
オキサゾロン環構造の形成、引き続く、このオキサゾロン環の開裂に伴う反応
性中間体も残留しており、これら反応性中間体に加水処理を施し、反応産物の
C末端は、カルボキシ基の表出する形態に復することが、その後の質量分析を
15 行う上で必要であり、例えば、塩基性含窒素芳香環化合物または第三アミン化
合物を溶解する水溶液を利用し、反応産物にかかる水溶液に接触させることで、
容易になされることが確認された。また、かかる有機塩基の触媒作用を利用す
る加水処理では、オキサゾロン環構造中の環状エステルへの加水反応に加えて、
O-アシル化保護されているヒドロキシ基におけるエステルへの加水反応、す
20 なわち、ヒドロキシ基における脱保護も進行すること、一方、より安定なN-
アシル化保護における脱保護の達成には至らないことも見出された。すなわち、
かかる加水処理を施すと、元のペプチド鎖に対して、そのN末端のアミノ基、
ならびに、ペプチド鎖に含有される可能性のあるリシン残基側鎖のアミノ基に
は、N-アシル化保護がなされたものとなる。また、C末端アミノ酸の分解反
25 応で生成した反応産物のペプチド鎖も、同じく、そのN末端のアミノ基、なら
びに、該ペプチド鎖に含有される可能性のあるリシン残基側鎖のアミノ基には、
N-アシル化保護がなされたものとなる。

以上の知見に加えて、本発明者らは、前述するそのN末端のアミノ基、なら

びに、ペプチド鎖に含有される可能性のあるリシン残基側鎖のアミノ基には、N-アシル化保護がなされた、長いペプチド鎖に対して、トリプシン消化処理を施すと、リシンまたアルギニン残基のC末端側ペプチド結合を開裂するトリプシンの切断部位特異性のうち、リシン残基側鎖のアミノ基には、N-アシル化保護がなされており、そのN-アシル化リシン残基では、ペプチド鎖の消化は起こらず、得られるペプチド断片は、アルギニン残基における消化に因るものとなることを確認した。より具体的には、かかるトリプシン消化処理を施すと、元のペプチド鎖と、C末端アミノ酸の分解反応で生成した一連の反応産物のペプチド鎖との混合物から、共通するペプチド断片として、C末端にアルギニン残基が一つ含まれる部分アミノ酸配列を有するペプチド断片、ならびに、C末端側の部分アミノ酸配列に由来し、アルギニン残基を含んでいない、元のペプチド鎖と一連の反応産物のペプチド鎖に由来する一群のC末端側ペプチド断片が得られることになる。その際、ペプチド鎖中に含有されるアルギニン残基の平均的な存在頻度を考慮すると、例えば、200アミノ酸程度の長いペプチド鎖中には、少なくとも、4個以上、多くとも、10個程度のアルギニン残基が存在するのみであり、前記のC末端にアルギニン残基が一つ含まれる、共通するペプチド断片は、4～10個程度、また、元のペプチド鎖に由来するC末端側ペプチド断片のアミノ酸数は、少なくとも15アミノ酸以上、50アミノ酸以下の範囲となる確度が相当に高いことに、本発明者らは想到した。

その上、本発明者らは、種々のペプチド断片について、MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry; マトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析) 法を利用し、該イオン化処理で生じる陽イオン種による分子量測定、ならびに陰イオン種による分子量測定を行った際、C末端にカチオニックなアミノ酸残基、特に、アルギニン残基が存在する場合、陽イオン種による分子量測定におけるピーク強度は、陰イオン種による分子量測定における対応ピーク強度よりも、有意にその相対強度は大きく、一方、C末端にカチオニックなア

ミノ酸残基が存在していない場合、陰イオン種による分子量測定におけるピーク強度は、陽イオン種による分子量測定における対応ピーク強度よりも、有意にその相対強度は大きくなるという、一般的傾向が明確に存在することを、実験的に再検証した。さらには、この実験的に再検証を行った一般的傾向を利用すると、MALDI-TOF-MS法を利用し、該イオン化処理で生じる陽イオン種による分子量測定、ならびに陰イオン種による分子量測定を行った際、前記のC末端にアルギニン残基が一つ含まれる、共通するペプチド断片と、C末端側の部分アミノ酸配列に由来し、アルギニン残基を含んでいない、元のペプチド鎖と一連の反応産物のペプチド鎖に由来する一群のC末端側ペプチド断片とを、合理的に弁別することが可能であることを確認した。すなわち、トリプシン消化で得られるC末端にアルギニン残基が一つ含まれる、共通するペプチド断片は、単一のピークとして、陽イオン種による分子量測定において、大きな相対強度で観測され、同時に、陰イオン種による分子量測定において、かかる共通するペプチド断片に対応するピークの強度は相対的に弱いものの、双方の測定結果を対比することで、容易に特定できるため、逆に、陰イオン種による分子量測定において、大きな相対強度で観測されるピークのうち、C末端側の部分アミノ酸配列に由来し、アルギニン残基を含んでいない、元のペプチド鎖と一連の反応産物のペプチド鎖に由来する一群のC末端側ペプチド断片は、一連のピークを示すものとして、容易に特定することが可能となる。

本発明者らは、これらの一連の知見に基づき、

(1) 対象とするペプチド鎖に対して、N-アシル化、O-アシル化による保護を施し、

(2) 対象とするペプチド鎖の存在状態に応じて、適正な選択された穏和な反応条件によって、C末端アミノ酸の選択的な分解反応を行い、

(3) 前記分解反応後、穏和な条件で、オキサゾロン環構造中の環状エステルへの加水反応、ならびに、O-アシル化による保護の脱保護反応を行い、

(4) N-アシル化保護は維持されている、元のペプチド鎖ならびに、C末端アミノ酸の選択的な分解反応で得られる一連の反応産物のペプチド鎖を含む

混合物に対して、トリプシン消化処理を施して、C末端にアルギニン残基が一つ含まれる、それらに共通するペプチド断片、ならびに、C末端側の部分アミノ酸配列に由来し、アルギニン残基を含んでいない、元のペプチド鎖と一連の反応産物のペプチド鎖に由来する一群のC末端側ペプチド断片を調製し、

- 5 (5) これらペプチド断片の混合物を、MALDI-TOF-MS法を利用し、該イオン化処理で生じる陽イオン種による分子量測定、ならびに陰イオン種による分子量測定を行った上で、双方の測定結果を対比することによって、C末端にアルギニン残基が一つ含まれる、該共通するペプチド断片と、アルギニン残基を含んでいない、元のペプチド鎖と一連の反応産物のペプチド鎖に由来する一群のC末端側ペプチド断片との弁別を行い、

(6) 上記の手法で弁別される、元のペプチド鎖と一連の反応産物のペプチド鎖に由来する一群のC末端側ペプチド断片の分子量差に基づき、本来のペプチド鎖のC末端アミノ酸配列を特定する、

- 15 かかる一連の工程を採用することで、種々のタンパク質などを構成する、長いペプチド鎖についても、そのC末端アミノ酸配列をより簡便に解析することが可能となることを見出し、また、その有用性を検証し、本発明を完成するに至った。

- すなわち、本発明は、上記する技術的な思想上の共通性を有するものの、対象とするペプチド鎖の存在状態に由来して、具体的な形態に相違が生じている
20 複数の形態を有しており、例えば、解析対象とするペプチドが、予め単離された乾燥試料である場合に適用する第一の形態、ならびに、解析対象とするペプチドが、予めゲル電気泳動法による分離がなされ、該ゲル担体上に担持された状態の試料である場合に適用する第二の形態を有している。

- 本発明の第一の形態にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法は、
25 解析対象とするペプチドのC末端アミノ酸配列を解析する方法であって、
対象とするペプチドより、化学的手段によりC末端アミノ酸を逐次的に分解して得られる一連の反応生成物を含む混合物を調製する工程と、
前記一連の反応生成物と、元となるペプチドとの分子量差を、質量分析法によ

り分析し、かかるC末端アミノ酸の逐次的分解に伴う分子量減少を測定する工程と、

測定された一連の分子量減少量に基づき、逐次的分解された一連のアミノ酸を特定し、C末端より配列させて、C末端のアミノ酸配列情報を得る工程とを
5 具え、

前記C末端アミノ酸を逐次的に分解する工程は、

対象とする前記ペプチドの乾燥試料に対して、乾燥雰囲気下、10℃～60℃の範囲に選択される温度において、

アルカン酸無水物にアルカン酸を少量添加してなる混合物より供給される、
10 蒸気状のアルカン酸無水物とアルカン酸とを作用させ、

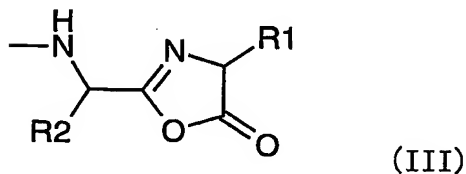
該ペプチドN末端のアミノ基ならびに、該ペプチドに含有されている可能性のあるリシン残基側鎖のアミノ基に対して、前記アルカン酸無水物由来のアシル基によるN-アシル化を施す、N-アシル化保護を施す前処理工程と、

前記N-アシル化保護済みの、対象とするペプチドの乾燥試料に対して、乾燥
15 雰囲気下、15℃～60℃の範囲に選択される温度において、

アルカン酸無水物にパーフルオロアルカン酸を少量添加してなる混合物より供給される、蒸気状のアルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸とを作用させ、

ペプチドのC末端において、下記する一般式 (III) :

20



(式中、

R1は、ペプチドのC末端アミノ酸の側鎖を表し、

R2は、前記C末端アミノ酸の直前に位置するアミノ酸残基の側鎖を表す) で
25 表記される5-オキサゾロン構造を経て、該5-オキサゾロン環の開裂に伴いC末端アミノ酸の分解を行う工程と、

前記C末端アミノ酸を逐次的に分解する工程で得られる一連の反応生成物を含む混合物に対して、

残余する前記アルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸とを乾燥状態において除去する後処理を施し、

- 5 次いで、塩基性含窒素芳香環化合物または第三アミン化合物を溶解する水溶液を利用し、蒸気状の塩基性含窒素芳香環化合物または第三アミン化合物と水分子を供給して、

前記塩基性の窒素含有有機化合物の共存下、前記反応生成物ペプチドに水分子を作用させ、

- 10 前記の加水処理を施した後、かかる一連の反応生成物を含む混合物に残余する、前記塩基性の窒素含有有機化合物と水分子を除去、乾燥する再乾燥後処理を行うことからなる加水処理の工程とを、少なくとも含んでなり、

前記C末端アミノ酸の逐次的分解に伴う分子量減少を測定する工程では、

- 15 再乾燥後処理後、前記加水処理済みの一連の反応生成物を含む混合物に対して、

- 緩衝溶液中において、トリプシンを作用させ、該ペプチド鎖のN末端のアミノ基ならびに、該ペプチド鎖に含有されている可能性のあるリシン残基側鎖のアミノ基に対する上記N-アシル化保護が保持されている、該ペプチド鎖のトリプシン酵素特異的な消化処理を施して、該ペプチド鎖中に存在するアルギニン残基のC末側ペプチド結合の選択的な切断によるペプチド断片化を行い、
- 20

脱塩処理を施し、前記緩衝溶液成分を除去して、該トリプシン消化処理済みペプチド断片を回収し、乾燥する工程を設け、

- 次いで、前記回収された該トリプシン消化処理済みペプチド断片を含む乾燥混合物について、MALDI-TOF-MS法を利用し、該イオン化処理で生じる陽イオン種による分子量測定、ならびに陰イオン種による分子量測定を行い、
- 25

前記陽イオン種による分子量測定、ならびに陰イオン種による分子量測定において測定される、対応するイオン種において、

前記トリプシン消化処理で生成するC末端にアルギニン残基を有するペプチド断片のピークは、

陽イオン種による分子量測定における強度は、陰イオン種による分子量測定における強度と比較して、相対的に大きな強度を与えるピークと判定し、

- 5 前記トリプシン消化処理で生成する、元となるペプチドに由来するC末端のペプチド断片ならびに、C末端アミノ酸を逐次的に分解して得られる一連の反応生成物に由来するC末端のペプチド断片のピークは、

陰イオン種による分子量測定における強度は、陽イオン種による分子量測定における強度と比較して、相対的に大きな強度を与えるピークと判定し、

- 10 該陰イオン種による分子量測定において、相対的に大きな強度を与える一連のピークに基づき、C末端アミノ酸の逐次的分解に伴う分子量減少を測定する手法を採用することを特徴とするペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法である。

この本発明の第一の形態にかかる解析方法では、

- 15 前記アルカン酸無水物にパーフルオロアルカン酸を少量添加してなる混合物に含まれるアルカン酸無水物として、炭素数2～4のアルカン酸の対称型酸無水物を用いることが好ましい。その際、前記炭素数2～4のアルカン酸の対称型酸無水物として、炭素数2～4の直鎖アルカン酸の対称型酸無水物を用いることがより好ましい。例えば、前記アルカン酸無水物にパーフルオロアルカン酸を少量添加してなる混合物に含まれるアルカン酸無水物として、無水酢酸を用いることがより好ましい。

- 20 一方、前記アルカン酸無水物にパーフルオロアルカン酸を少量添加してなる混合物に含まれるパーフルオロアルカン酸として、当該パーフルオロアルカン酸の示す pK_a は、0.3～2.5の範囲であるパーフルオロアルカン酸を用いることが好ましい。その際、前記アルカン酸無水物にパーフルオロアルカン酸を少量添加してなる混合物に含まれるパーフルオロアルカン酸として、炭素数2～4のパーフルオロアルカン酸を用いることがより好ましい。例えば、前記炭素数2～4のパーフルオロアルカン酸として、炭素数2～4の直鎖パーフ

ルオロアルカン酸を用いることがより好ましい。

さらには、前記アルカン酸無水物にパーフルオロアルカン酸を少量添加してなる混合物中における、パーフルオロアルカン酸の含有比率は、アルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸との合計体積に対して、1～20体積%の範囲
5 に選択することが望ましい。また、前記アルカン酸無水物にパーフルオロアルカン酸を少量添加してなる混合物を利用する処理に際して、前記乾燥雰囲気は、水分に加えて、酸素も除去された状態であることが一層好ましい。例えば、前記乾燥雰囲気は、気密容器内において、その内部の大気を真空排気することで、達成されていることが好適である。なお、前記アルカン酸無水物にパーフルオ
10 ロアルカン酸を少量添加してなる混合物を利用する処理に際して、その温度は、15℃～50℃の範囲に選択される温度とすることがより望ましい。

一方、本発明の第二の形態にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法は、

解析対象とするペプチドのC末端アミノ酸配列を解析する方法であって、
15 対象とするペプチドより、化学的手段によりC末端アミノ酸を逐次的に分解して得られる一連の反応生成物を含む混合物を調製する工程と、

前記一連の反応生成物と、元となるペプチドとの分子量差を、質量分析法により分析し、かかるC末端アミノ酸の逐次的分解に伴う分子量減少を測定する工程と、

20 測定された一連の分子量減少量に基づき、逐次的分解された一連のアミノ酸を特定し、C末端より配列させて、C末端のアミノ酸配列情報を得る工程とを
具え、

前記C末端アミノ酸を逐次的に分解する工程は、

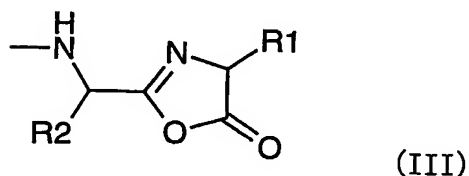
予めゲル電気泳動法による分離がなされ、該ゲル担体上に担持された状態の
25 対象とするペプチド試料に対して、
前記ゲル担体中に含浸される水溶媒を、該ゲル状物質の溶解を引き起こさず、かつ、水に対して親和性を有する極性非プロトン性溶媒を用いて、希釈除去することにより、該ゲル担体の脱水処理を行う工程と、

- 前記脱水処理を施した後、該ゲル担体上に担持された状態の対象とするペプチド試料に対して、30℃～80℃の範囲に選択される温度において、該ゲル状物質内に浸潤でき、膨潤状態に維持可能である、双極性非プロトン性溶媒中に、アルカン酸無水物を溶解してなる溶液を用いて、該アルカン酸無水物溶液中に該ゲル担体を浸漬することにより、担持された状態の対象とするペプチド試料にアルカン酸無水物を作用させ、対象とするペプチドのN末端のアミノ基ならびに、該ペプチド中に含有される可能性のあるリシン残基側鎖上のアミノ基に、予め、前記アルカン酸無水物を構成するアルカン酸に由来するアシル基によるN-アシル化保護を施し、
- 10 次いで、該ゲル状物質の溶解を引き起こさず、かつ、前記アルカン酸無水物、ならびに双極性非プロトン性溶媒に対して親和性を有する極性非プロトン性溶媒を用いて、希釈除去することにより、N-アシル化反応の停止と反応試薬の除去を行う前処理工程と、

- 前記N-アシル化保護の前処理を施した後、該ゲル担体上に担持された状態の対象とするペプチド試料に対して、30℃～80℃の範囲に選択される温度において、

- 該ゲル状物質内に浸潤でき、膨潤状態に維持可能である、双極性非プロトン性溶媒中に、パーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる比率で溶解してなる混合溶液を用いて、該混合溶液中に該ゲル担体を浸漬することにより、担持された状態の対象とするペプチド試料にアルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸とを作用させ、

ペプチドのC末端において、下記する一般式 (III) :



- 25 (式中、

R1 は、ペプチドのC末端アミノ酸の側鎖を表し、

R 2 は、前記 C 末端アミノ酸の直前に位置するアミノ酸残基の側鎖を表す) で表記される 5-オキサゾロン構造を経て、該 5-オキサゾロン環の開裂に伴い C 末端アミノ酸の逐次的分解を行い、

5 前記 C 末端アミノ酸の逐次的分解反応に利用した混合溶液を、該ゲル状物質の溶解を引き起こさず、かつ、前記パーフルオロアルカン酸とアルカン酸無水物、ならびに双極性非プロトン性溶媒に対して親和性を有する極性非プロトン性溶媒を用いて、希釈除去することにより、分解反応の停止と反応試薬の除去を行う工程と、

さらに、前記 C 末端アミノ酸を逐次的に分解する反応で得られる一連の反応生成物を含む混合物に対して、該ゲル担体上に担持された状態のまま、
10 塩基性含窒素芳香環化合物または第三アミン化合物を溶解する水溶液を利用し、該水溶液中にゲル担体を浸漬することにより、前記塩基性の窒素含有有機化合物の共存下、前記反応生成物ペプチドに水分子を作用させ、加水処理を施し、

次いで、前記ゲル担体中に含浸される水溶液を、該ゲル状物質の溶解を引き
15 起こさず、かつ、水に対して親和性を有する極性非プロトン性溶媒を用いて、希釈除去することにより、該ゲル担体の再脱水処理を施すことからなる、付加的な加水処理と再脱水処理の工程とを有し、

前記 C 末端アミノ酸の逐次的分解に伴う分子量減少を測定する工程では、再脱水処理後、前記加水処理済みの一連の反応生成物を含む混合物に対して、
20 該ゲル担体上に担持された状態で、緩衝溶液中に溶解するトリプシンを作用させ、該ペプチド鎖の N 末端のアミノ基ならびに、該ペプチド鎖に含有されている可能性のあるリシン残基側鎖のアミノ基に対する上記 N-アシル化保護が保持されている、該ペプチド鎖のトリプシン酵素特異的な消化処理を施して、該ペプチド鎖中に存在するアルギニン残基の C 末側ペプチド結合の選択的な切
25 断によるペプチド断片化を行って、

かかるゲル担体上から該ペプチド断片の遊離と、前記緩衝溶液中への溶出を行い、その後、脱塩処理を施し、前記緩衝溶液成分を除去して、該トリプシン消化処理済みペプチド断片を回収し、乾燥する工程を設け、

次いで、前記回収された該トリプシン消化処理済みペプチド断片を含む乾燥混合物について、MALDI-TOF-MS法を利用し、該イオン化処理で生じる陽イオン種による分子量測定、ならびに陰イオン種による分子量測定を行い、

- 5 前記陽イオン種による分子量測定、ならびに陰イオン種による分子量測定において測定される、対応するイオン種において、

前記トリプシン消化処理で生成するC末端にアルギニン残基を有するペプチド断片のピークは、

- 10 陽イオン種による分子量測定における強度は、陰イオン種による分子量測定における強度と比較して、相対的に大きな強度を与えるピークと判定し、

前記トリプシン消化処理で生成する、元となるペプチドに由来するC末端のペプチド断片ならびに、C末端アミノ酸を逐次的に分解して得られる一連の反応生成物に由来するC末端のペプチド断片のピークは、

- 15 陰イオン種による分子量測定における強度は、陽イオン種による分子量測定における強度と比較して、相対的に大きな強度を与えるピークと判定し、

該陰イオン種による分子量測定において、相対的に大きな強度を与える一連のピークに基づき、C末端アミノ酸の逐次的分解に伴う分子量減少を測定する手法を採用することを特徴とするペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法である。

- 20 この本発明の第二の形態にかかる解析方法では、

- 前記パーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる比率で溶解してなる混合溶液に含まれるアルカン酸無水物として、炭素数2～4のアルカン酸の対称型酸無水物を用いることが好ましい。その際、前記炭素数2～4のアルカン酸の対称型酸無水物として、炭素数2～4の直鎖アルカン酸の対称型酸無水物を用いることがより好ましい。例えば、前記パーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる比率で溶解してなる混合溶液に含まれるアルカン酸無水物として、無水酢酸を用いることがより好ましい。
- 25

一方、前記パーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる

比率で溶解してなる混合溶液に含まれるパーフルオロアルカン酸として、当該パーフルオロアルカン酸の示す pK_a は、0.3～2.5の範囲であるパーフルオロアルカン酸を用いることが好ましい。また、前記パーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる比率で溶解してなる混合溶液に含まれるパーフルオロアルカン酸として、炭素数2～4のパーフルオロアルカン酸を用いることが好ましい。その際、前記炭素数2～4のパーフルオロアルカン酸として、炭素数2～4の直鎖パーフルオロアルカン酸を用いることがより好ましい。

なお、前記パーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる比率で溶解してなる混合溶液中における、アルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸との含有比率は、アルカン酸無水物100容当たり、パーフルオロアルカン酸1～20容の範囲に選択することがより好ましい。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の第一の形態にかかるペプチドからC末端アミノ酸を逐次的に分解する処理における、ペプチド乾燥試料を対象とする際の詳細操作手順の一例を例示する工程フローを示す図である。

図2は、本発明の第二の形態にかかるペプチドからC末端アミノ酸を逐次的に分解する処理における、ゲル上に担持されたペプチド試料を対象とする際の詳細操作手順の一例を例示する工程フローを示す図である。

図3は、本発明の第一の形態にかかるペプチドからC末端アミノ酸を逐次的に分解する処理方法に従って、ウマ・ミオグロビンの乾燥試料について、そのグロビン・ペプチド鎖のC末端アミノ酸を逐次的に分解して得られる反応産物混合物をトリプシン消化して得られるペプチド断片を、MALDI-TOF-MS装置において、陽イオン種検出モードで測定した質量分析スペクトルの一例を示す図である。

図4は、本発明の第一の形態にかかるペプチドからC末端アミノ酸を逐次的に分解する処理方法に従って、ウマ・ミオグロビンの乾燥試料について、その

グロビン・ペプチド鎖のC末端アミノ酸を逐次的に分解して得られる反応産物混合物をトリプシン消化して得られるペプチド断片を、MALDI-TOF-MS装置において、陰イオン種検出モードで測定した質量分析スペクトルの一例を示す図である。

5 図5は、本発明の第二の形態にかかるペプチドからC末端アミノ酸を逐次的に分解する処理方法に従って、ゲル上に担持されたウマ・ミオグロビン試料について、そのグロビン・ペプチド鎖のC末端アミノ酸を逐次的に分解して得られる反応産物混合物をトリプシン消化して得られるペプチド断片を、MALDI-TOF-MS装置において、陽イオン種検出モードで測定した質量分析スペクトルの一例を示す図である。

図6は、本発明の第二の形態にかかるペプチドからC末端アミノ酸を逐次的に分解する処理方法に従って、ゲル上に担持されたウマ・ミオグロビン試料について、そのグロビン・ペプチド鎖のC末端アミノ酸を逐次的に分解して得られる反応産物混合物をトリプシン消化して得られるペプチド断片を、MALDI-TOF-MS装置において、陰イオン種検出モードで測定した質量分析スペクトルの一例を示す図である。

図7は、ウマ・ミオグロビンを構成する、グロビン・ペプチド鎖のアミノ酸配列中に含まれる、トリプシンによる、アルギニン残基のC末側ペプチド結合での切断部位、ならびに、N-アセチル化保護を施した際、そのC末側ペプチド結合での切断が防止されるリシン残基を示す。

図8は、参考例に記載する、C末端にアルギニン残基を有する単離乾燥ペプチド、N-アセチル化Glu¹-Fibrinopeptide断片に対して、本発明に採用されるC末端アミノ酸を逐次的に分解する処理条件に従って、該ペプチド鎖のC末端アミノ酸を逐次的に分解して得られる反応産物混合物を、MALDI-TOF-MS装置において、陰イオン種検出モード（下）と陽イオン種検出モード（上）で測定した質量分析スペクトルの対比を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明をより詳しく説明する。

本発明にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法は、基本的には、解析対象のペプチドに対して、そのペプチドのC末端アミノ酸を逐次的に分解除去して、ペプチドが短縮された一連の反応産物を作製し、さらに、この一連の
5 反応産物と、元となるペプチドとをトリプシン消化して得られるペプチド断片のうち、該一連の反応産物に由来するC末端側ペプチド断片の分子量と、元となるペプチドに由来するC末端側ペプチド断片の分子量との差異に基づき、除去されたアミノ酸を特定する手法を採用している。より具体的には、かかるトリプシン消化して得られるC末端側ペプチド断片は、そのトリプシンに特異的な切断部位で切断されており、さらには、この一連の反応産物に由来するC末端側ペプチド断片の分子量と、元となるペプチドに由来するC末端側ペプチド断片の分子量の測定手段として、MALDI-TOF-MS装置を利用するが、そのイオン化過程は、ペプチド断片にプロトン (H^+) が付加された陽イオン種と、ペプチド断片からプロトン (H^+) が離脱された陰イオン種とをそれぞれ測定
10 することを可能としている。その際、C末端側ペプチド断片を構成するアミノ酸残基中にはアルギニン残基やリシン残基が含まれていないため、かかるアルギニン残基やリシン残基に由来する陽イオン種の安定化機構はなく、陽イオン種を測定した結果と、陰イオン種を測定した結果とを比較した際、アミノ酸残基中にはアルギニン残基やリシン残基が含まれている、トリプシン消化による他のペプチド断片とは、その相対強度は、異なる挙動を示す現象を、MALDI-TOF-MS装置によって測定される複数種のピーク中より、一連のC末端側ペプチド断片に起因するピークの特定・弁別に利用している。

すなわち、本発明にかかる解析方法における最大の特徴は、ペプチドのC末端アミノ酸を逐次的に分解除去する工程において、そのペプチド鎖の途中でのペプチド結合分断という副次的反応を効果的に回避することで、
25 前記トリプシン消化処理後に得られるペプチド断片の混合物中に、元のペプチドをトリプシン消化した際に生じる、共通的なN末側のペプチド断片、ならびに目的とする一連の反応産物に由来するC末端側ペプチド断片以外に、副次的

なペプチド結合分断反応に由来するペプチド断片が混入することを抑制する点にある。加えて、かかるペプチド鎖の途中でのペプチド結合分断という副次的反応を回避する上で、予め対象とするペプチド鎖に対して、N-アシル化、O-アシル化による保護を施して、この保護をも利用し、さらには、最終的なトリプシン消化の処理に先立ち、O-アシル化による保護の脱保護は行うものの、

5 リシン残基上のN-アシル化保護を保持する状態とすることで、トリプシン消化による断片化が、アルギニン残基のC末側ペプチド結合でのみ生じるようにし、不必要に細分化されたペプチド断片の生成を回避しつつ、目的とする一連の反応産物に由来するC末端側ペプチド断片は、MALDI-TOF-MS測定に適合する分子量範囲内とできる点も、本発明にかかる解析方法における大きな特徴である。

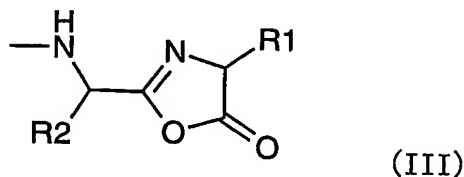
10

その際、本発明に利用される、対象とするペプチドのC末端アミノ酸を逐次的に分解除去する反応では、水分を除去した環境とした上で、比較的に低い加熱条件において、

15 反応試薬として、アルカン酸無水物に、少量のパーフルオロアルカン酸を組み合わせたものを利用して、高いプロトン供与能を示すパーフルオロアルカン酸の触媒作用によって、アルカン酸無水物をペプチド鎖C末端のカルボキシ基の活性化試薬として作用させ、

ペプチドのC末端において、下記する一般式 (III) :

20



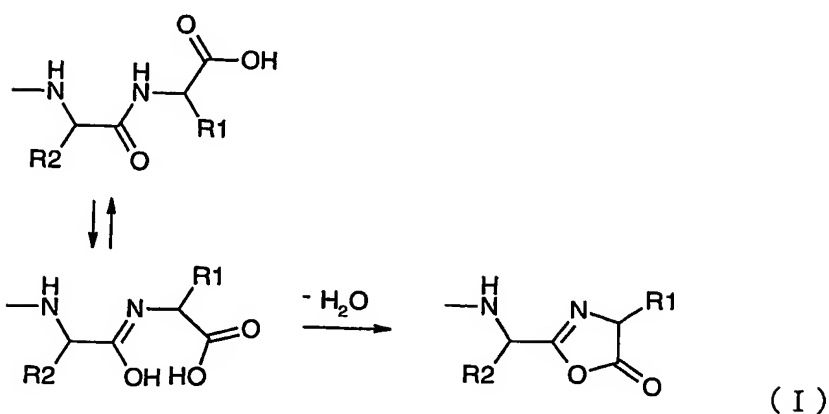
(式中、

R 1 は、ペプチドのC末端アミノ酸の側鎖を表し、

R 2 は、前記C末端アミノ酸の直前に位置するアミノ酸残基の側鎖を表す) で

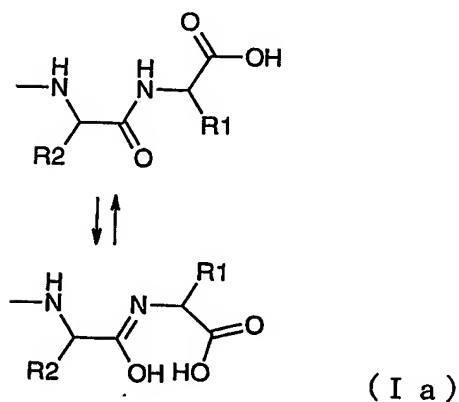
25 表記される 5-オキサゾロン構造を一旦形成し、該 5-オキサゾロン環の開裂に伴いC末端アミノ酸の分解を行う方法を利用している。

かかる 5-オキサゾロン環形成の反応は、全体として見ると、反応式 (I) :



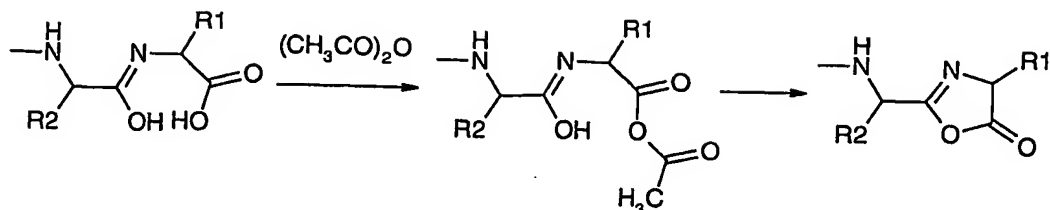
5 として表記されるものの、本発明にかかる C 末端アミノ酸の選択的な分解方法では、

まず、下記する反応式 (I a) :



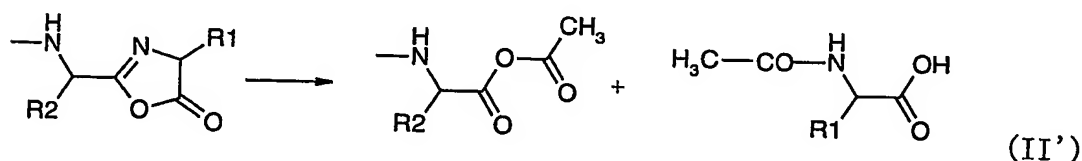
10 で示されるケト-エノール互換異性化の過程を、少量存在しているパーフルオロアルカン酸を乾燥したペプチドに対して、プロトン供与体として機能させることで、エノール型をとる比率を高めている。

15 次いで、エノール型において、表出されているヒドロキシ基と C 末端カルボキシ基の間で、分子内エステル結合を形成し、5-オキサゾロン環を完成させる。その際、本発明にかかる C 末端アミノ酸の選択的な分解方法では、C 末端カルボキシ基の活性化を行う試薬として、アルカン酸無水物を利用し、例えば、下記の反応式 (I b) :



(Ib)

で例示されるような、非対称型酸無水物へと変換し、活性化されたC末端カルボキシ基が反応に関与するものとしている。その結果、かかる反応は、穏和な温度条件でも進行する。一方、系内には、水分が存在しない環境に維持するとともに、反応性の相対的に低いアルカン酸無水物を利用するため、ペプチド鎖の途中に存在するペプチド結合の開裂反応の進行は、かかる穏和な温度条件では抑制されている。また、本発明にかかるC末端アミノ酸の選択的な分解方法においては、一旦形成された5-オキサゾロン環から、例えば、反応式(II')で表記される反応：



等の反応を経て、C末端のアミノ酸の離脱と、次段の反応中間体の形成を進行して、逐次的なC末端アミノ酸の選択的な分解が進むと推断される。

なお、ペプチド鎖中のセリン残基($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-\text{CO}-$)、トレオニン残基($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH})-\text{CO}-$)では、その側鎖上のヒドロキシ基($-\text{OH}$)に起因して、加熱環境下では、例えば、セリン残基($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-\text{CO}-$)の α 位のアミノ基($-\text{NH}-$)と β 位のヒドロキシ基($-\text{OH}$)の間で、N, O-アシル転位反応が生じると、引き続き、生成するエステル結合の分解が進行し、セリン残基のN末側でペプチドの切断が生じるという副反応、また、条件によっては、 β 位にヒドロキシ基($-\text{OH}$)が存在しているトレオニン残基($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH})-\text{CO}-$)

H) $-CO-$ においても、同様のN, O-アシル転位反応が契機となる反応機構によって、トレオニン残基のN末側でペプチドの切断が生じるという副反応が生じる可能性がある。また、アミノ酸長の短いペプチドにおいては、リシン残基 ($-NH-CH((CH_2)_3-NH_2)-CO-$) でも、その側鎖上のアミノ基 ($-NH_2$) に起因して、加熱環境下では、リシン残基 ($-NH-CH(CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2)-CO-$) の α 位のアミノ基 ($-NH-$) と ϵ 位のアミノ基 ($-NH_2$) の間で、アミド結合の交換反応が生じると、引き続き、生成する ϵ 位のアミド結合の分解が進行し、リシン残基のN末側でペプチドの切断が生じるという副反応が懸念される。

- 10 本発明においては、逐次的なC末端アミノ酸の分解反応は、乾燥状態、穏和な温度条件で行われるものの、前記のセリン残基 ($-NH-CH(CH_2OH)-CO-$)、トレオニン残基 ($-NH-CH(CH(CH_3)OH)-CO-$)、リシン残基 ($-NH-CH(CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2)-CO-$) が関与する副反応をより確実に回避するため、逐次的なC末端アミノ酸の分解反応に先立ち、予め、N-アシル化、O-アシル化による保護を施す前処理工程を設けている。

- 20 このN-アシル化、O-アシル化による保護を施す前処理工程は、本発明にかかる第一の形態では、対象とするペプチドの乾燥試料に対して、乾燥雰囲気下、 $10^\circ C \sim 60^\circ C$ の範囲に選択される温度において、アルカン酸無水物にアルカン酸を少量添加してなる混合物より供給される、蒸気状のアルカン酸無水物とアルカン酸とを作用させることで、アルカン酸の有するプロトン供与能を利用して、アルカン酸無水物とアミノ基 ($-NH_2$)、ヒドロキシ基 ($-OH$) との反応を促進して、N-アシル化、O-アシル化を達成している。その際、アルカン酸の有するプロトン供与能は、パーフルオロアルカン酸の示すプロトン供与能よりも劣るため、ペプチド鎖のC末端における5-オキサゾロン環を形成する反応を進行させるには至らない。

また、本発明にかかる第二の形態では、ゲル上に担持された状態のペプチド試料に対して、予めゲルの脱水処理を施した後、この前処理工程において、3

0℃～80℃の範囲に選択される温度において、該ゲル状物質内に浸潤でき、膨潤状態に維持可能である、双極性非プロトン性溶媒中に、アルカン酸無水物を溶解してなる溶液を用いて、該アルカン酸無水物溶液中に該ゲル担体を浸漬することにより、担持された状態の対象とするペプチド試料にアルカン酸無水物を作用させることで、N-アシル化、O-アシル化を達成している。この双極性非プロトン性溶媒中での液相反応は、プロトン供与能を有するアルカン酸の酸触媒作用を利用しなくとも、十分に進行する。また、かかる液相反応に付随して、系内で、アルカン酸の生成がなされ、その触媒作用も付加され、徐々に反応の促進がなされる。但し、系内で派生するアルカン酸の有するプロトン供与能は、パーフルオロアルカン酸の示すプロトン供与能よりも劣るため、ペプチド鎖のC末端における5-オキサゾロン環を形成する反応を進行させるには至らない。

加えて、本発明では、かかる前処理工程において、リシン残基($-NH-CH(CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2)-CO-$)の ϵ 位のアミノ基($-NH_2$)に加えて、ペプチド鎖のN末端のアミノ基に対しても、N-アシル化が達成できる条件を選択することで、例えば、C末端アミノ酸の逐次的な分解反応において、そのC末端カルボキシ基の活性化がなされた際、誤って、隣接するペプチド鎖のN末端のアミノ基と反応を起こす事態を予め防止することもできている。さらには、後処理工程において、加水処理を施した際に、リシン残基($-NH-CH(CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2)-CO-$)の ϵ 位のアミノ基($-NH_2$)ならびにペプチド鎖のN末端のアミノ基に対する、N-アシル化保護は、脱保護を生じない加水処理条件を選択する結果、最終的に、トリプシン消化処理を施す際、側鎖上のアミノ基がN-アシル化保護されているリシン残基のC末側では、トリプシンによる酵素的消化反応は進まず、トリプシン消化で得られるペプチド断片は、アルギニン残基のC末側での消化によるものに限定される。

本発明では、このリシン残基側鎖上のアミノ基に対して、N-アシル化保護がなされた状態で、最終的に、トリプシン消化処理を施す工程を実施することで、ペプチド鎖が、アルギニン残基とリシン残基の二種の切断部位で消化され、

不必要に多くの断片化を受けることを回避し、同時に、ペプチド鎖中に適度な頻度で含有されるアルギニン残基におけるトリプシン消化によって、長いペプチド鎖は複数のペプチド断片に分割でき、結果として、得られるC末端側ペプチド断片の分子量は、MALDI-TOF-MS測定に適合する分子量範囲内とできる利点を積極的に利用している。

加えて、本発明においては、トリプシン消化処理後、脱塩処理し、ペプチド断片を回収し、乾燥した後、MALDI-TOF-MS装置を利用して、トリプシン消化処理を施して得られるペプチド断片の混合物に由来するイオン種の分子量を測定する。なお、トリプシン消化処理後、脱塩処理を行うことで、回収、乾燥されるペプチド断片は、各種の塩を形成するものではなく、本来のペプチド部分単体とされている。そのイオン化過程では、各ペプチド断片に対して、プロトン (H^+) が付加された陽イオン種と、プロトン (H^+) が離脱された陰イオン種とが生成でき、測定モードを選択することにより、陽イオン種と陰イオン種とをそれぞれ個別に測定する。本発明においては、トリプシン消化処理で生成するペプチド断片として、元のペプチド鎖と、C末端アミノ酸の逐次的な分解反応で生成する反応産物とで共通するN末側アミノ酸配列に由来する、一連のペプチド断片群では、その断片C末端に、プロトン (H^+) 受容能に富むグアニジノ基を持つアルギニン残基が存在しており、プロトン (H^+) が付加された陽イオン種の安定化が図られるが、一方、C末端側ペプチド断片では、かかるアルギニン残基は存在しておらず、アルギニン残基に因るプロトン (H^+) が付加された陽イオン種の安定化は起こらない。前記する相違点に付随して、MALDI-TOF-MS装置で測定される、陽イオン種の質量分析スペクトル中では、その断片C末端にアルギニン残基を有する、共通するN末側アミノ酸配列に由来する、一連のペプチド断片群に起因するピーク強度が、相対的に強くなる。一方、アルギニン残基の存在していないC末端側ペプチド断片では、プロトン (H^+) 供与能を示すカルボキシ基 ($-COOH$) がそのC末端に存在しており、MALDI-TOF-MS装置で測定される、陰イオン種の質量分析スペクトル中において、かかるC末端側ペプチド断片群に起因するピーク強

度が、相対的に強くなる。

本発明では、脱塩処理を施され、乾燥されたペプチド断片を、MALDI-TOF-MS装置での測定に供することに伴う、前記の陽イオン種の質量分析スペクトルと陰イオン種の質量分析スペクトルとを対比した際の、相対的強度の相違を利用して、その断片C末端にアルギニン残基を有する、共通するN末側アミノ酸配列に由来する、一連のペプチド断片群に起因するピークを弁別し、さらに、陰イオン種の質量分析スペクトル中において、元のペプチド鎖と、C末端アミノ酸の逐次的な分解反応で生成する反応産物とで共通するN末側アミノ酸配列に由来する、一連のC末端側ペプチド断片群に起因するピークを、容易に特定することができる。

該陰イオン種による分子量測定において、相対的に大きな強度を与える一連のピークに基づき、C末端アミノ酸の逐次的分解に伴う分子量減少を測定し、対応する分子量変化を与えるアミノ酸種類の帰属を行う。なお、かかるアルギニン残基の存在していないC末端側ペプチド断片は、少なくとも、トリプシン消化処理によって、そのN末端アミノ酸残基の α 位のアミノ基($-NH_2$)を有しており、陽イオン種の質量分析スペクトル上でも、対応するピークを示すので、アミノ酸種類の帰属結果を、陽イオン種の質量分析スペクトルで観察される対応するピークの分子量を利用して、検証することもできる。

以下に、本発明の第一の形態にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法、ならびに本発明の第二の形態にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法について、個々により詳しく説明する。

先ず、本発明の第一の形態にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法では、上述する本発明を特徴付ける(1)～(6)の工程中、(1)～(3)に相当する、対象とするペプチドより、化学的手段によりC末端アミノ酸を逐次的に分解して得られる一連の反応生成物を含む混合物を調製する工程では、予め単離処理されているペプチドの乾燥試料を対象として、下記する処理を行う。

C末端アミノ酸を逐次的に分解する反応工程に先立って、予め、該ペプチドN末端のアミノ基ならびに、該ペプチドに含有されている可能性のあるリシン

残基側鎖のアミノ基に対して、前記アルカン酸無水物由来のアシル基によるN-アシル化を施す、N-アシル化保護を施す前処理工程を実施する。この前処理工程において施される、リシン残基側鎖のアミノ基に対するN-アシル化保護は、上述する最終的に、トリプシン消化処理を行った際、リシン残基のC末側ペプチド結合での切断を防止する目的を有するため、後述する加水処理において、リシン残基側鎖上のN-アシル化保護では、脱保護が進行しないものの、同時に成されるO-アシル化保護においては、脱保護が十分に進行するアシル基を選択することが望ましい。従って、本発明の第一の形態においては、ペプチドの乾燥試料に対して、気相から蒸気として供給して、N-アシル化、ならびにO-アシル化反応を行うことができる反応試薬として、求電子的なアシル化剤であるアルカン酸無水物と、そのプロトン供与能によって、該アシル化反応の促進を図る触媒として、アルカン酸との組み合わせを利用している。

この前処理工程で使用される、アルカン酸無水物とアルカン酸は、乾燥雰囲気下、一定の分圧比において蒸気として供給して、ペプチド鎖に作用させるため、気密状態の反応容器内で、10℃～60℃の範囲に選択される温度に反応容器全体を加熱、保温することで、アルカン酸無水物にアルカン酸を少量添加してなる混合物から蒸散させる形態とする。すなわち、10℃～60℃の範囲に選択される温度で、所望の分圧を達成できるもの、具体的には、炭素数2～4のアルカン酸、ならびに、該炭素数2～4のアルカン酸由来の対称型酸無水物を利用することが好ましい。特に、炭素数2～4の直鎖アルカン酸、ならびに、該炭素数2～4の直鎖アルカン酸由来の対称型無水物を利用することがより好ましく、その際、対称型の前記アルカン酸無水物は、少量添加されるアルカン酸に由来する対称型無水物であることがさらに好ましい。すなわち、アルカン酸無水物と、少量添加されるアルカン酸とを同一種とすると、かかるN-アルカノイル化、O-アルカノイル化反応の進行する間に、仮にアシル基交換反応が生じて、最終的に得られる、N-アルカノイル化、O-アルカノイル化保護に、異なるアルカノイル基が混在することは無い。従って、仮に、後述する加水処理において、O-アルカノイル化保護の脱保護が達成されないも

のが、残留した場合にも、脱保護の達成されたものとの分子量差は、予め判明しており、かかる夾雑物に由来するピークの同定はより簡単なものとなる。このN-アシル化保護を施す前処理工程では、通常、無水酢酸と酢酸の組み合わせを利用することがより望ましい。

- 5 具体的には、かかるN-アシル化保護を施す前処理反応も、アルカン酸無水物とアルカン酸とを蒸気として、ペプチドの乾燥試料に供給して、反応を進めるため、適正な蒸気圧を得る上では、その後に実施する前記C末端アミノ酸を逐次的に分解する工程で利用する前記アルカン酸無水物と、同じアルカン酸無水物は好適に利用できる。加えて、このアルカン酸無水物は、乾燥雰囲気下、
- 10 10℃～60℃の範囲に選択される温度では、ペプチドの切断等の不要な副次反応を引き起こすには、その反応性は十分に低いので、かかる前処理においては、共存させるアルカン酸は、パーフルオロアルカン酸と比較して、その酸触媒作用は格段に劣るので、さらに、不要な副次反応を引き起こすことなく、N-アシル化保護を施すことが可能となる。
- 15 加えて、対象とする長いアミノ酸配列のペプチド、例えば、タンパク質など、二次構造、三次構造を構成している場合には、予め、デフォールディング処理を加えて、該多次構造を示さないペプチド鎖に変換しておくことで、そのN末端のアミノ基をN-アシル化保護する条件では、ペプチド中に存在する何れのリシン残基側鎖のアミノ基に対しても、N-アシル化保護が同時に進行する。
- 20 さらには、ペプチド中に存在するセリン残基ならびにトレオニン残基側鎖のヒドロキシ基においてもO-アシル化反応が進み、その保護がなされる。その他、ペプチド中に存在するチロシン残基側鎖のフェノール性ヒドロキシ基も、その反応性は相違するものの、部分的にO-アシル化がなされる。これらの複数のアシル化保護もなされる前処理工程を設ける結果として、リシン残基側鎖のア
- 25 ミノ基、セリン残基ならびにトレオニン残基側鎖のヒドロキシ基は、何れも保護修飾を受けたものとなり、最早不要な副次反応に関与できないものとなる。

なお、この前処理工程で使用する、アルカン酸無水物とアルカン酸との組み合わせは、不要な副次反応、例えば、ペプチドの途中での切断を生じる懸念は

ほとんどないものであるが、その反応温度は、 $10^{\circ}\text{C} \sim 60^{\circ}\text{C}$ の範囲に選択される温度、より好ましくは、かかる反応温度は、室温付近、あるいは、室温より僅かに高い範囲内に選択することが好ましく、より具体的には、 $15^{\circ}\text{C} \sim 50^{\circ}\text{C}$ の範囲に選択することが好ましい。また、前記アルカン酸無水物にアルカン酸を少量添加してなる混合物中における、アルカン酸の添加比率は、アルカン酸無水物とアルカン酸との合計した体積に対して、 $2 \sim 10$ 体積%の範囲、具体的には、 5 体積%に選択することが好ましい。

なお、この前処理工程におけるN-アシル化反応の反応速度は、利用されるアルカン酸無水物とアルカン酸の分圧（気相濃度）ならびに反応温度に依存するため、かかる前処理工程の反応時間は、主に反応温度に応じて、適宜選択することが望ましい。例えば、反応温度を 50°C に選択する際には、反応時間を1時間以内、例えば、 30 分間に選択することで、ペプチドのN末端アミノ基に対するN-アシル化を完了することも可能である。その際、アルカン酸無水物とアルカン酸とによるアシル化反応を促進する目的で、触媒量のピリジン、例えば、アルカン酸無水物とアルカン酸の合計に対して、 $0.1 \sim 1.0$ 体積%のピリジンを添加することがより好ましい。かかるピリジン塩基はプロトン受容体として機能するため、例えば、アミノ基へのアシル化に伴い離脱すべきプロトンの除去がより速やかになされる。

さらには、対象とするペプチドが、例えば、隣接するペプチドのシステインとの間で、酸化型の $-S-S-$ 結合を形成する、あるいは、同一分子内で $-S-S-$ 結合を形成しているシステインを含む場合には、予め常用の還元処理を施し、かかる架橋を解消し、還元型のシステインを含むペプチドに変換する。また、ペプチド中に存在する還元型のシステインに対しては、その側鎖のスルファニル基（ $-SH$ ）にカルボキシメチル化やピリジリエチル化などを施し、予めその保護を行う。より具体的には、対象とする長いアミノ酸配列のペプチド、例えば、タンパク質など、二次構造、三次構造を構成している場合には、予め、デフォールディング処理を加えて、該多次構造を示さないペプチド鎖に変換しておく処理をなす過程で、かかるタンパク質同一分子内で $-S-S-$ 結

合を形成しているシステインを含む可能性を有する場合には、予め常用の還元処理を施し、かかる架橋を解消し、還元型のシステインを含むペプチドに変換する。加えて、該ペプチド中に存在する還元型のシステインに対しては、その側鎖のスルファニル基（—SH）にカルボキシメチル化やピリジリエチル化など

5 などを施し、予めその保護を行う。

その他、かかる前処理工程における反応手順は、気密状態とできる反応容器内に、アルカン酸無水物にアルカン酸を少量添加した液状混合物を入れ、この液状混合物を一旦冷却して、蒸気圧を低下した状態で、反応容器内を排気し、密閉して、反応温度まで昇温し、容器内にアルカン酸無水物を蒸発させる手法

10 が挙げられる。かかる手順を採用すると、反応容器内への水分の混入を防止できる利点もある。加えて、反応系内に酸素が残留しないように、真空排気を行うと、例えば、対象とするペプチドを構成するアミノ酸残基のうち、メチオニンに存在するイオウが、酸素により酸化を受け、その式量が増加することを防止でき、分子量の測定を基礎とする本発明の方法においては、かかる酸化を抑

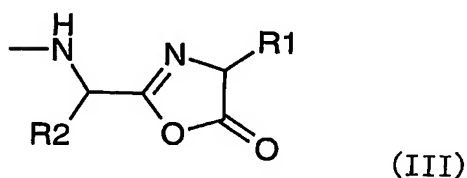
15 制することは、より高い確度を達成する上で、より好ましいものとなる。前処理工程の反応を終えた後、反応容器内に残余する反応試薬を除去した後、次のC末端アミノ酸を逐次的に分解する反応工程に移行する。

本発明の第一の形態では、このC末端アミノ酸を逐次的に分解する反応では、前処理工程に引き続き、N-アシル化保護済みのペプチドの乾燥試料に対して、

20 乾燥雰囲気下、15℃～60℃の範囲に選択される温度において、

アルカン酸無水物にパーフルオロアルカン酸を少量添加してなる混合物より供給される、蒸気状のアルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸とを作用させ、

ペプチドのC末端において、下記する一般式 (III) :

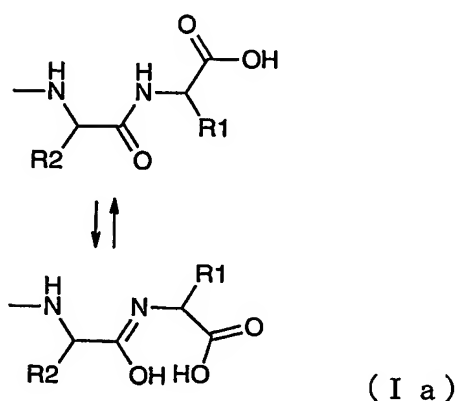


(式中、

R 1 は、ペプチドの C 末端アミノ酸の側鎖を表し、

R 2 は、前記 C 末端アミノ酸の直前に位置するアミノ酸残基の側鎖を表す) で
 表記される 5-オキサゾロン構造を経て、該 5-オキサゾロン環の開裂に伴い
 5 C 末端アミノ酸の分解を行う。

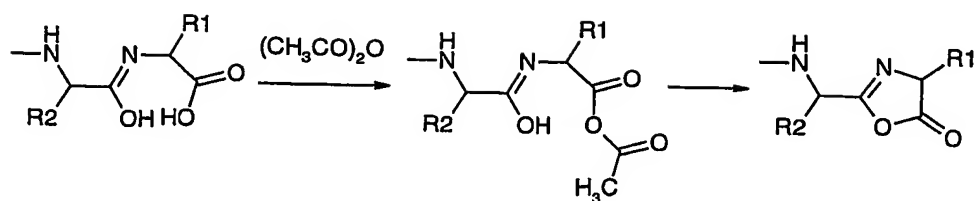
かかる 5-オキサゾロン環形成の反応では、乾燥雰囲気下、先ず、下記する
 反応式 (I a) :



10 で示されるケト-エノール互換異性化の過程において、蒸気状のパーフルオロ
 アルカン酸を乾燥したペプチドに対して、プロトン供与体として機能させるこ
 とで、エノール型をとる比率を高めている。

次いで、エノール型において、表出されているヒドロキシ基と C 末端カルボ
 キシ基の間で、分子内エステル結合を形成し、5-オキサゾロン環を完成させ
 15 る。その際、恐らくは、蒸気状のパーフルオロアルカン酸は、このエステル化
 反応においても、プロトン・ドナーとして作用し、酸触媒下におけるエステル
 化反応を誘起していると推定される。本発明の第一の形態では、C 末端カルボ
 キシ基の活性化を行い試薬として、アルカン酸無水物を利用し、例えば、下記
 の反応式 (Ib) :

20



(Ib)

で例示されるような、非対称型酸無水物へと変換し、活性化されたC末端カルボキシ基が反応に関与するものとしている。その結果、かかる反応は、穏和な温度条件で進行でき、反応温度を15℃～60℃の範囲に選択することが可能となっている。なお、かかる反応温度は、室温付近、あるいは、室温より僅かに高い範囲内に選択することが好ましく、より具体的には、15℃～50℃の範囲に選択することがより好ましい。

加えて、前記アルカン酸無水物にパーフルオロアルカン酸を少量添加してなる混合物を利用する処理の間に、ペプチドのN末端のアミノ基に対して、前記アルカン酸無水物によって、N-アシル化が通常起こるため、系内において、N-アシル化保護がなされるものの、予め、N-アシル化保護を目的とする前処理を施す方がより望ましい。

従って、本発明の第一の形態は、利用されるパーフルオロアルカン酸の高いプロトン供与能を利用するものであり、該パーフルオロアルカン酸の示すpKaは、0.3～2.5の範囲であるパーフルオロアルカン酸を用いることが好ましい。加えて、このパーフルオロアルカン酸は、蒸気状態として、乾燥ペプチド試料へ供給する必要があるため、15℃～60℃の範囲に選択する前記温度において、所望の蒸気圧を得られる揮発性に優れたパーフルオロアルカン酸であることが望ましい。その観点からも、炭素数2～4のパーフルオロアルカン酸は、より適するものであり、さらには、直鎖状の炭素数2～4のパーフルオロアルカン酸が、より適するものであり、具体的には、トリフルオロ酢酸(CF₃COOH)、ペンタフルオロプロパン酸(CF₃CF₂COOH)、ヘプタフルオロブタン酸(CF₃CF₂CF₂COOH)を利用することがより望ましい。

また、上記する活性化試薬として利用される、アルカン酸無水物は、反応に従って、消費されるため、蒸気状態として供給するアルカン酸無水物の蒸気圧

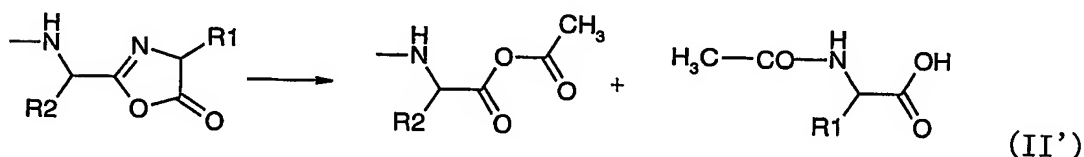
を所定の範囲に維持しつつ反応を行うことが望ましい。例えば、その手段としては、反応を行う系を気密状態とし、系内に存在するアルカン酸無水物の蒸気圧を安定化する方法が挙げられる。より具体的には、気密状態とできる反応容器内に、アルカン酸無水物にパーフルオロアルカン酸を少量添加した液状混合物
5 物を入れ、この液状混合物を一旦冷却して、蒸気圧を低下した状態で、反応容器内を排気し、密閉して、反応温度まで昇温し、容器内にアルカン酸無水物を蒸発させる手法が挙げられる。かかる手順を採用すると、反応容器内への水分の混入を防止できる利点もある。なお、反応系内に酸素が残留しないように、真空排気を行うと、例えば、対象とするペプチドを構成するアミノ酸残基のうち、
10 メチオニンに存在するイオウが、酸素により酸化を受け、その式量が増加することを防止でき、分子量の測定を基礎とする本発明の方法においては、かかる酸化を抑制することは、より高い確度を達成する上で、より好ましいものとなる。

一方、利用されるアルカン酸無水物は、反応温度まで昇温した際、適正な蒸気圧を生じる限り、種々のものが利用可能である。ただし、反応温度を前記する好適な範囲、例えば、 $15^{\circ}\text{C} \sim 50^{\circ}\text{C}$ の範囲に選択する際に、十分な蒸気圧を与えるものが好ましく、従って、炭素数2～4のアルカン酸の対称型酸無水物を用いることが好ましい。なかでも、前記対称型酸無水物として、炭素数2～4の直鎖アルカン酸の対称型酸無水物を用いることがより好ましく、特に、
15 炭素数2の直鎖アルカン酸の対称型酸無水物、すなわち、無水酢酸が好適に利用できる。かかるアルカン酸無水物は、C末端カルボキシ基の活性化に利用されるため、その際、立体障害を生じることの少ないものが好ましく、その点でも、前記例示の無水酢酸などがより好適である。

この分解反応に利用される、アルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸とは、ともに蒸気状として、乾燥ペプチド試料に対して作用させ、一旦形成された5-オキサゾロン環が、系外から進入した水分により、加水されて、元に戻ることを回避するため、反応は乾燥雰囲気下で行う。その観点から、一般に、
25 密閉された反応容器内でかかる反応を行うことが望ましい。なお、反応容器内

に当初供給される、アルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸との混合物は、室温では液状混合物とし、アルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸とが均一に混合された状態とする。このアルカン酸無水物にパーフルオロアルカン酸を少量添加してなる混合物は、触媒として利用するパーフルオロアルカン酸は、
 5 反応の間、原則的に消費されないので、少量とすることができる。より具体的には、気相中に蒸気として存在するパーフルオロアルカン酸は、同じく、蒸気として存在するアルカン酸無水物と対比して、相対的に低い濃度とすることができることを意味する。逆には、利用するアルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸の種類によって、例えば、反応温度における、その飽和蒸気圧に応じて、目的とする気相中の分圧比（気相濃度比）を達成できる混合比率の液状混合物を適宜利用する。例えば、前記アルカン酸無水物にパーフルオロアルカン酸を少量添加してなる混合物中における、パーフルオロアルカン酸の含有比率は、アルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸との合計体積に対して、1～
 10 20体積%の範囲、より好ましくは、3～10体積%の範囲に選択することが望ましい。

また、本発明の第一の形態においては、一旦形成された5-オキサゾロン環から、例えば、反応式(II')で表記される反応：



20 等の反応を経て、C末端のアミノ酸の離脱と、次段の反応中間体の形成を進行して、逐次的なC末端アミノ酸の選択的な分解が進むと推断される。従って、かかる反応を終えた後、得られる反応産物は、上述する反応式(II)に示される、C末端にカルボキシ基が表出されているもの以外に、中間産物である5-オキサゾロン環構造に留まるもの、あるいは、反応中間体の一形態として、C
 25 末端が非対称型酸無水物に至ったものも混入したものとなる。

かかる逐次的なC末端アミノ酸の選択的な分解処理工程における反応は、少

なくとも、反応式 (I b) で例示される 5-オキサゾロン環構造の形成過程と、
反応式 (II') で例示される 5-オキサゾロン環構造の開裂による末端アミノ酸
の分離過程との二段階の素反応から構成される。そのため、全体の反応速度は、
これら各過程の反応速度の双方に依存するものの、主に、利用するアルカン酸
5 無水物とパーフルオロアルカン酸の蒸気分圧 (気相濃度) ならびに反応温度に
依存している。加えて、一連の反応産物は、逐次的な反応で形成されるため、
得られる一連の反応産物において達成される、短縮される C 末端アミノ酸配列
の最大長は、処理時間が長くなるとともに、延長される。従って、かかる逐次
的な C 末端アミノ酸の選択的な分解処理工程における処理時間は、主に、利用
10 するアルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸の蒸気分圧 (気相濃度) なら
びに反応温度に応じて、また、解析すべき C 末端アミノ酸配列の目標とするア
ミノ酸長をも考慮して、適宜選択するものである。

また、逐次的な C 末端アミノ酸の選択的な分解処理工程において生成される、
上記反応式 (II') に例示される C 末端にカルボキシ基が表出されていない反応
15 中間体の形態をとるものをも、C 末端にカルボキシ基が表出されている形態に
復する目的で、後処理工程として、加水処理の工程を設ける。すなわち、本発
明の第一の形態では、この加水処理の工程において、前記 C 末端アミノ酸を逐
次的に分解する工程で得られる一連の反応生成物を含む混合物に対して、残余
するアルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸とを乾燥状態において除去す
20 る後処理を施した上で、塩基性含窒素芳香環化合物または第三アミン化合物を
溶解する水溶液を利用し、蒸気状の塩基性含窒素芳香環化合物または第三アミ
ン化合物と水分子を供給して、これら塩基性の窒素含有有機化合物の共存下、
前記反応生成物ペプチドに水分子を作用させて、5-オキサゾロン環内のエス
テル結合、ならびに、反応中間体の一形態である、C 末端の非対称型酸無水物
25 構造を加水処理して、それぞれ、C 末端のアミノ酸残基にカルボキシ基 ($-COOH$) を再生させる。さらに、塩基性の窒素含有有機化合物の共存下、水分
子を作用させると、前処理工程において O-アシル化保護を施した、ペプチド
鎖中に存在するセリン残基とトレオニン残基側鎖のヒドロキシ基、ならびにチ

ロシン残基側鎖のフェノール性ヒドロキシ基では、その脱保護も進行する。一方、リシン残基側鎖のアミノ基、ならびにペプチド鎖N末端のアミノ基に対するN-アシル化保護は、脱保護を受けず、残留される。この加水処理を施した後、かかる一連の反応生成物を含む混合物に残余する、前記塩基性の窒素含有有機化合物と水分子を除去、乾燥する再乾燥後処理を行う。この加水処理を施すことで、元のペプチドと一連の反応産物のペプチド鎖は、リシン残基側鎖のアミノ基は、N-アシル化保護されており、C末端にカルボキシ基は表出した形態とした上で、後述するトリプシン消化処理に供される。

かかる加水処理に利用する、蒸気状の塩基性含窒素芳香環化合物または第三アミン化合物は、例えば、残留しているC末端が非対称型酸無水物に至ったものと反応して、アミド結合を形成することがなく、また、水溶液とした際、均一な溶液とできるので、好ましいものである。利用可能な、塩基性含窒素芳香環化合物としては、適用な蒸気圧を与えることができる、単環式の含窒素芳香環化合物が好ましく、例えば、ピリジンはより好適に利用できる。また、利用可能な第三アミン化合物は、前記ピリジン塩基が示す比較的に弱い塩基性と同程度の塩基性を有するものが好ましく、例えば、DMAE ($(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) などが好適に利用できる。例えば、ピリジンを利用する際には、水溶液全体の体積に対して、ピリジンを、5～15体積%の範囲、より具体的には、10体積%に選択することが好ましい。また、(ジメチルアミノ)エタノール(DMAE)を利用する際には、水溶液全体の体積に対して、DMAEを、1～20体積%の範囲、より具体的には、10体積%に選択することが好ましい。

これら単環式の含窒素芳香環化合物や第三アミン化合物は、水分子とともに、蒸気として、上記反応産物を含む乾燥混合試料に作用させる。この後処理も、一般に、密閉された反応容器内でかかる反応を行うことが望ましい。また、かかる後処理では、水分子を利用するため、その蒸気圧を一定以上とすることが必要となるので、例えば、60℃以上の温度、但し、反応容器内の機械的強度を考慮すると、100℃以下の範囲に選択することは望ましい。速やかに、加

水処理を完了するためには、100℃または、それより若干低い温度を選択することが望ましい。

例えば、本発明の第一の形態にかかるC末端アミノ酸の選択的な分解方法では、前処理工程、C末端アミノ酸の選択的な分解反応工程、後処理工程を、同一の反応器内で連続した形態で実施することが、一層好ましいものである。かかる工程のフローの一例を、図1に例示する。各工程を終えた段階で、ペプチド試料に、その工程で利用した試薬の残留を回避するため、それぞれ、ドライ・アップ操作を設けている。このドライ・アップ操作は、減圧留去でなされるのが一般的であり、その際、反応により派生する分解された末端アミノ酸等の除去を同時に実施できる場合もある。図1に例示する工程フローでは、利用するアルカン酸無水物として、極めて高い純度のものが容易に入手可能な無水酢酸を利用する事例を示している。

一方、図1に例示する工程フローでは、C末端アミノ酸の選択的な分解反応工程における処理時間は、かかる工程中に短縮されるC末端アミノ酸配列のアミノ酸長として、最長の場合、10数アミノ酸長、最小では、3アミノ酸長を目標とする際、利用する無水酢酸とフルオロアルカン酸の比率、ならびに処理温度に応じて、選択される処理時間の範囲を例示している。一般に、フルオロアルカン酸の比率を増し、かつ処理温度をより高く設定すると、反応速度は増し、より短い処理時間で、目標とする最長のアミノ酸配列短縮量を達成した一連の反応産物の調製が可能となる。

また、前処理工程においては、蒸気状の無水酢酸と酢酸を利用して、ペプチドのN末端のアミノ基へのN-アセチル化を実施しているが、この無水酢酸と酢酸の組み合わせにおいても、場合によっては、極僅かであるが、上記反応式(I a)で表記されるC末端カルボキシ基の活性化反応、それに起因する副次反応が誘起されることが懸念される。この副次的な反応を抑制する目的で、少量のピリジン蒸気を共存させ、ペプチドのC末端カルボキシ基に対して、ピリジン塩基が弱い付加塩を形成させることで、不要な副次反応に対する保護効果を持たせることが可能である。この付加塩型の保護は、かかる前処理工程を

5 終える際、ドライ・アップ操作を設けて、減圧下、ピリジン塩基の留去を行うことで、簡便に脱保護され、次段のC末端アミノ酸の選択的な分解反応工程において、問題を生じることはない。これらの観点から、この付加塩型の保護には、ピリジン塩基など、減圧下に簡単に留去可能で、塩基性も弱い、含窒素複素芳香環化合物を少量添加することが好ましい。また、この付加塩型の保護は、アミノ酸側鎖のカルボキシ基に対する保護機能を有するため、アミノ酸側鎖のカルボキシ基に起因する、不要な副次反応をも同時に効果的に抑制することが可能となる。

10 本発明の第一の形態では、上記のC末端アミノ酸の逐次的な除去により調製される一連の反応産物の分子量と、元のペプチドの分子量との差異を、質量分析法による測定結果を利用して決定し、その分子量差に相当するアミノ酸を特定する。従って、通常、かかる質量分析法による測定に供する混合物中に、元のペプチドも、その分子量の特定が可能な程度残存する状態とすることが望ましい。

15 具体的には、本発明の第一の形態にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法は、C末端アミノ酸配列として、最大10数アミノ酸長程度までの解析に適用するが、その際、対応する最大10数種に及ぶ一連の反応産物の含有比率は、その最小の含有比率のものは、最大含有比率のものの、少なくとも、1/10程度を下回らない状態とすることが望ましい。また、元のペプチドの残
20 存量も、最大含有比率の反応産物に対して、少なくとも、1/10程度を下回らない状態とすることが望ましい。一方、必要とするC末端アミノ酸配列情報は、10アミノ酸以内となることが多く、10アミノ酸程度の分解が進む程度に処理時間を選択すると、前記の含有比率に関する条件を満足することができる。

25 次に、本発明の第一の形態における、上述する本発明を特徴付ける(1)～(6)の工程中、(4)～(6)に相当する、前記一連の反応生成物と、元となるペプチドとの分子量差を、質量分析法により分析し、かかるC末端アミノ酸の逐次的分解に伴う分子量減少を測定する工程と、測定された一連の分子量減

少量に基づき、逐次的分解された一連のアミノ酸を特定し、C末端より配列させて、C末端のアミノ酸配列情報を得る工程に関して、さらに詳しく説明する。

本発明では、分子量の測定に、MALDI-TOF-MS装置を利用することで、高分子量のペプチド鎖に関しても、その分子量を精度よく測定することを可能としている。但し、かかるペプチドなどの高分子量分子の測定に適する、MALDI-TOF-MS装置を利用しても、有効にイオン化を達成できる分子量には、自ずから上限があり、高い精度で測定可能なペプチドのアミノ酸長の最大は、30～50アミノ酸を超えないことが望ましい。加えて、分子量差に基づき、対応するアミノ酸の特定を行うので、例えば、AsnとAsp、GlnとGluの如く、式量の差異が1のアミノ酸残基相互の区別を高い精度で行う上では、基準となる、最長のペプチド、すなわち、C末端アミノ酸の除去がなされていないペプチドの分子量は、4000を超えない範囲、より好ましくは、3000を超えない範囲であることがより好ましい。これをアミノ酸長に換算すると、長くとも、40アミノ酸、より好ましくは、30アミノ酸を超えない範囲とすることが好ましい。

本発明の第一の形態では、前記のアミノ酸長を遥かに超えるタンパク質などの長いアミノ酸長のペプチドへの適用を容易にするため、質量分析の実施に先立ち、切断アミノ酸配列部位の特異性を有し、かつ、その酵素反応効率に優れるプロテアーゼである、トリプシンを利用して、ペプチド鎖の特異的な分断処理を行い、得られるC末端ペプチド断片を利用して、C末端アミノ酸の逐次的な除去により調製される一連の反応産物の分子量と、元のペプチドの分子量との差異を測定する。

このトリプシン消化処理は、再乾燥後処理後、前記加水処理済みの一連の反応生成物を含む混合物に対して、緩衝溶液中において、トリプシンを作用させ、該ペプチド鎖のN末端のアミノ基ならびに、該ペプチド鎖に含有されている可能性のあるリシン残基側鎖のアミノ基に対するN-アシル化保護が保持されている、該ペプチド鎖のトリプシン酵素特異的な消化処理を施している。その際、リシン残基側鎖のアミノ基に対するN-アシル化保護が保持されているため、

N-アシル化保護リシン残基のC末側ペプチド結合の切断は生じず、該ペプチド鎖中に存在するアルギニン残基のC末側ペプチド結合の選択的な切断が起こる。

例えば、リシン残基とアルギニン残基の双方で切断が起こると、得られるペプチド断片の総数は相当な数に達し、その結果、各断片の平均的なアミノ酸長は短くなり、狭い分子量範囲に、相当な数のペプチド断片に起因するピークが密集する傾向となる。相当な数のペプチド断片に起因するピークが密集すると、その中から、目的とする一群のC末側ペプチド断片を特定する上で、障害となる場合もある。特に、C末端アミノ酸の逐次的な分解を施した、一連の反応産物に由来するC末側ペプチド断片は、除去されるアミノ酸数が多くなると、その含有比率は小さくなり、近接して、他のペプチド断片が存在すると、目的とするC末側ペプチド断片を特定する上で、大きな障害となる場合もある。本発明では、該ペプチド鎖中に存在するアルギニン残基のC末側ペプチド結合の選択的な切断を利用するので、得られるペプチド断片の総数は必要以上に多くな

5
10
15

ることを回避でき、同時に、目的とするC末側ペプチド断片のアミノ酸長は、上述するMALDI-TOF-MS装置を利用する際、適当とされるアミノ酸数の範囲内とすることが可能である。

該トリプシン消化処理後、脱塩処理を施し、前記緩衝溶液成分を除去して、該トリプシン消化処理済みペプチド断片を回収し、乾燥した後、この回収された該トリプシン消化処理済みペプチド断片を含む乾燥混合物について、MALDI-TOF-MS法を利用し、該イオン化処理で生じる陽イオン種による分子量測定、ならびに陰イオン種による分子量測定を行う。

20

既に説明したように、本発明では、MALDI-TOF-MS装置を利用することに伴い、その陽イオン種による分子量測定、ならびに陰イオン種による分子量測定の結果に基づき、

25

トリプシン消化処理で生成するC末端にアルギニン残基を有するペプチド断片では、該アルギニン残基に起因して、その対応するイオン種のピークは、陽イオン種による分子量測定における強度は、陰イオン種による分子量測定に

おける強度と比較して、相対的に大きな強度を与えるピークと判定し、

トリプシン消化処理で生成する、元となるペプチドに由来するC末端のペプチド断片ならびに、C末端アミノ酸を逐次的に分解して得られる一連の反応生成物に由来するC末端のペプチド断片にはアルギニン残基が存在しないので、

5 その対応するイオン種のピークは、

陰イオン種による分子量測定における強度は、陽イオン種による分子量測定における強度と比較して、相対的に大きな強度を与えるピークと判定し、

陰イオン種による分子量測定において、相対的に大きな強度を与える、一連のC末端ペプチド断片に対応する陰イオン種の分子量に基づき、C末端アミノ酸の逐次的分解に伴う分子量減少を測定する手法を採用している。

10 なお、本発明の第一の形態にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法では、分子量の差異に基づき、逐次的に除去されたアミノ酸を特定するため、同一の式量を有する、ロイシン (Leu) 残基とイソロイシン (Ile) 残基とを弁別することは原理的に不可能であり、この点は、従来の質量分析法を利用するC末端アミノ酸配列解析手法と同様である。一方、グルタミン (Gln) 残基とリシン (Lys) 残基も同一の式量を有するものの、リシン (Lys) 残基の側鎖にN-アルカノイル化を施すため、本発明では、両者の弁別が可能となっている。また、C末端アミノ酸を除去する反応では、反応式 (I b) に例示するように、アミド結合のエノール型への変換と、それに続く、5-オキサゾロン環構造の形成が必須であり、アミド結合を構成するカルボニル基 (C=O) とイミノ基 (-NH-) が存在しない環状アミノ酸プロリン (Pro) がC末端アミノ酸となった時点で、それ以上の分解反応は進行しない。逆に、処理時間を延長した際、それ以上のC末端アミノ酸の除去が起きないことを確認することで、その要因となるアミノ酸残基は、環状アミノ酸プロリン (Pro) と推定することが可能である。

25 一方、本発明において、ペプチドより化学的手段によりC末端アミノ酸を逐次的に分解して、一連の反応生成物を得る反応では、アルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸を作用させるため、仮に、ペプチド中のセリン残基 (-N

H-CH (CH₂OH) -CO-) やトレオニン残基 (-NH-CH (CH (C
H₃) OH) -CO-) に存在するヒドロキシ基、N末端のアミノ基、リシン残
基 (-NH-CH (CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂) -CO-) の ε 位のアミノ基
に対して、予めO-アシル化、N-アシル化保護を行う前処理工程を実施しな
くとも、かかるC末端アミノ酸を逐次的に分解する反応条件では、これらO-
アシル化、N-アシル化反応も併行的に進行する。そのため、セリン残基 (-
NH-CH (CH₂OH) -CO-) やトレオニン残基 (-NH-CH (CH (C
H₃) OH) -CO-) に存在するヒドロキシ基に起因する、N, O-アシル転
位反応等の副次反応に対する、競争的な阻害効果が達成される。しかしながら、
本発明では、最終的にペプチド断片の分子量を測定するため、ペプチド中のセ
リン残基 (-NH-CH (CH₂OH) -CO-) やトレオニン残基 (-NH-
CH (CH (CH₃) OH) -CO-) に存在するヒドロキシ基などに起因する
ペプチド鎖途中での断裂をより確実に防止する必要がある、C末端アミノ酸を
逐次的に分解する反応工程に先立ち、予めO-アシル化、N-アシル化保護を
行う前処理工程を実施する構成を選択している。

仮に、最終的に得られる反応産物において、セリン残基やトレオニン残基に
アセチル化がなされたものが多数混入していると、かかる多アセチル化体と、
脱アセチルがなされたものとの分子量差は、式量 42 の整数倍、具体的には、
84、126、168 は、セリン残基 (-NH-CH (CH₂OH) -CO-) の式量 87、
グルタミン残基 (-NH-CH (CH₂CH₂-CONH₂) -CO-) の式量 128、グルタミン酸残基 (-NH-CH (CH₂CH₂-COOH)
-CO-) の式量 129、N-アセチルリシン残基 (-NH-CH (CH₂CH₂CH₂NH-COCH₃) -CO-) の式量 170 と類似しており、場合
によっては、多アセチル化体を主なピークと誤認し、脱アセチルがなされたも
のを、前記するアミノ酸の除去がなされたものとする懸念がある。本発明では、
後処理工程における加水処理において、セリン残基やトレオニン残基における
O-アシル化保護に対する脱保護が十分に進行する条件を選択することで、か
かる懸念に対する十分な対策もなされている。加えて、ペプチド断片化を行っ

た後、分子量の測定を行うことで、測定される分子量を、式量差が1であるグルタミン残基とグルタミン酸残基との弁別が可能な分析精度の測定がなされる範囲としており、上述する残留しているアセチル基数の差と、類似する式量を示すアミノ酸残基の間では、式量差が2～3であり、多くの場合、かかる誤認を生じる可能性は払拭している。

5 なお、前記反応用の液状試薬、あるいはそのコンポーネント・キットの液状試薬それぞれを収納でき、前記試料容器中に保持されるペプチド試料に対して、前記反応用の液状試薬を一定量づつ加え、しかもそれらを直接接触しない状態を維持可能な液状試薬の保持機構を具え、前記試料容器をその内部に収納可能な反応容器は、その内部を真空排気でき、また、反応終了後、残余する反応用の液状試薬を、減圧下、留去することができ、反応時には、気密構造とできる形態とすることが好ましい。また、かかる反応容器内で、試薬の蒸気を発生する際、容器壁と反応を生じることのない材質とすることが必要である。従って、化学反応の反応容器に利用されるガラス材料を利用したものが好適である。また、密閉操作に利用されるコック類は、テフロンなどの材質のものが好適に利用される。

引き続き、本発明の第二の形態にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法について、より詳しく説明する。

20 先ず、本発明の第二の形態は、上述する本発明の第一の形態が対象とする、予め単離処理されているペプチドの乾燥試料に代えて、予めゲル電気泳動法による分離がなされ、該ゲル担体上に担持された状態のペプチドを対象としている。従って、ゲル担体上に担持された状態のペプチドに対しては、C末端アミノ酸を逐次的に分解する反応に際して、蒸気状の反応試薬を利用する固相における反応手法を有効に適用できないため、ゲル担体中に、相当する反応試薬を浸潤させ、液相反応を行わせる手法に変更している。その際、上述する本発明を特徴付ける(1)～(6)の工程中、(1)～(3)に相当する、対象とするペプチドより、化学的手段によりC末端アミノ酸を逐次的に分解して得られる一連の反応生成物を含む混合物を調製する工程では、対象とするペプチドを、

ゲル担体から予め単離処理せず、該ゲル担体上に担持された状態のまま、ペプチド試料に対して、そのC末端アミノ酸を逐次的に分解する反応を可能としている。

すなわち、本発明の第二の形態では、本発明を特徴付ける（１）～（６）の
5 工程中、（１）～（３）に相当する工程として、かかるC末端アミノ酸を逐次的に分解する工程では、

予めゲル電気泳動法による分離がなされ、該ゲル担体上に担持された状態の対象とするペプチド試料に対して、次段のアシル化反応を行う前処理工程において、その障害となる水分を予め除去するため、ゲル担体中に含浸される水溶媒を、該ゲル状物質の溶解を引き起こさず、かつ、水に対して親和性を有する
10 極性非プロトン性溶媒を用いて、希釈除去することにより、該ゲル担体の脱水処理を行う工程を設け、下記するアシル化保護を施す前処理工程、C末端アミノ酸の逐次的な分解工程、反応産物に対する加水処理を行う後処理工程を行う。

なお、予めゲル電気泳動法による分離を行う際、利用されるゲル状物質は、
15 特定の分子量範囲に相当する複数種のペプチドに関して、それぞれ個別な、分離されたスポット（又は、バンド）を示す条件、具体的には、ゲルを構成するポリアクリルアミドの含有比率を選択し、ゲル内部に形成される微細な穴構造内部の間隙サイズを調整する。その結果、分離されたスポット（又は、バンド）は、例えば、SDS-PAGE法では、それぞれペプチド鎖分子量、表面の電
20 荷量の差異に起因する電気泳動速度の相違するペプチドが局在している。かかるペプチドは、ゲル中に形成される微細な穴構造内部に保持されており、ゲル状物質中に含浸される水を除去する際、該ゲル状物質の溶解を引き起こさず、かつ、水に対して親和性を有する極性非プロトン性溶媒を用いて、水溶媒のみを該極性非プロトン性溶媒中に希釈・溶出する手法を利用すると、かかる脱水
25 処理操作を終えた後も、目的とするペプチドは、分離されたスポット（又は、バンド）位置のゲル担体上に担持された状態に維持できる。すなわち、上述の脱水処理に利用する極性非プロトン性溶媒は、ゲルを構成するポリアクリルアミドなどのゲル状物質との親和性は、水溶媒より一般に劣っているため、ゲル

状物質中の微細な穴構造の間隙サイズを維持していた、間隙表面に対して溶媒和している水溶媒の除去とともに、嵩体積の減少が進む。該脱水処理に利用する極性非プロトン性溶媒として、例えば、ポリアクリルアミド・ゲルを用いる際、好適な極性非プロトン性溶媒として、水に対して親和性に富む、アセトニ
5 トリル (CH_3CN) などの炭素数4以下のニトリル類、アセトンなどの炭素数4以下のケトン類などを挙げることができる。また、これら脱水処理に利用する極性非プロトン性溶媒は、水よりも蒸散し易く、蒸散・乾固すると、嵩体積が減少し、収縮したゲル担体となる。

本発明の第二の形態においては、ペプチド鎖にアシル化保護を施す前処理工
10 程は、前記脱水処理を施した後、該ゲル担体上に担持された状態の対象とするペプチド試料に対して、 $30^\circ\text{C} \sim 80^\circ\text{C}$ の範囲に選択される温度において、該ゲル状物質内に浸潤でき、膨潤状態に維持可能である、双極性非プロトン性溶媒中に、アルカン酸無水物を溶解してなる溶液を用いて、該アルカン酸無水物溶液中に該ゲル担体を浸漬することにより、担持された状態の対象とするペ
15 プチド試料にアルカン酸無水物を作用させ、対象とするペプチドのN末端のアミノ基ならびに、該ペプチド中に含有される可能性のあるリシン残基側鎖上のアミノ基に、予め、前記アルカン酸無水物を構成するアルカン酸に由来するアシル基によるN-アシル化保護を施す。この前処理工程において施される、リシン残基側鎖のアミノ基に対するN-アシル化保護は、上述する最終的に、ト
20 リプシン消化処理を行った際、リシン残基のC末側ペプチド結合での切断を防止する目的を有するため、後述する加水処理において、リシン残基側鎖上のN-アシル化保護では、脱保護が進行しないものの、同時になされるO-アシル化保護においては、脱保護が十分に進行するアシル基を選択することが望ましい。その際、本発明の第二の形態においては、求電子的なアシル化剤であるアル
25 カン酸無水物は、双極性非プロトン性溶媒中では、かかる溶媒に因る分子内の分極がなされ、ペプチドに対して作用させた際、アミノ基と、ヒドロキシ基に対して、N-アシル化、ならびにO-アシル化反応が進行する。かかるN-アシル化、ならびにO-アシル化反応に付随して、該アルカン酸無水物由来の

アルカン酸が副生すると、そのアルカン酸の示す触媒作用によって、N-アシル化、ならびにO-アシル化反応の促進がなされる。つまり、本発明の第二の形態では、ゲル担体内で副生するアルカン酸の拡散・散逸は速やかには進まない点を利用し、ゲル担体中に留まっている、副生するアルカン酸を反応の促進を図る触媒として利用できるのもので、反応試薬として、アルカン酸無水物のみを使用している。

この前処理工程で使用される、アルカン酸無水物は、30℃～80℃の範囲に選択される温度で、リシン残基側鎖のアミノ基に対するN-アシル化保護の反応が可能な反応性を示すもの、具体的には、炭素数2～4のアルカン酸由来の対称型酸無水物を利用することが好ましい。特に、炭素数2～4の直鎖アルカン酸由来の対称型無水物を利用することがより好ましい。すなわち、対称型のアルカン酸無水物を利用すると、副生するアルカン酸も同一種となるので、かかるN-アルカノイル化、O-アルカノイル化反応の進行する間に、仮にアシル基交換反応が生じて、最終的に得られる、N-アルカノイル化、O-アルカノイル化保護に、異なるアルカノイル基が混在することは無い。従って、仮に、後述する加水処理において、O-アルカノイル化保護の脱保護が達成されないものが、残留した場合にも、脱保護の達成されたものとの分子量差は、予め判明しており、かかる夾雑物に由来するピークの同定はより簡単なものとなる。このN-アシル化保護を施す前処理工程では、通常、無水酢酸を利用することがより望ましい。

双極性非プロトン性溶媒中では、アルカン酸無水物の分子内分極が誘起され、求電子反応試薬として、該ペプチドのアミノ基に作用する結果、30℃以上でも、十分にかかるN-アシル化反応は進行する。通常、反応の促進を図るためには、反応温度を50℃以上に選択することが好ましいが、一般に、密閉された反応容器内でかかる反応を行うため、反応容器内の機械的強度を考慮すると、100℃以下の範囲に選択することが望ましい。N-アシル化反応に付随して、アルカン酸が生成するが、その量は僅かであり、かかるアルカン酸の示すプロトン供与能と、共存するアルカン酸無水物とに起因する副次的反応は、上述の

温度範囲では、通常問題とはならない。より具体的には、系内に生成するアルカン酸は、例えば、パーフルオロアルカン酸と比較して、その酸触媒作用は格段に劣り、かつ、その存在量も少ないため、上述する温度条件では、パーフルオロアルカン酸とアルカン酸無水物とを利用するC末端アミノ酸を逐次的に分解する工程における主な反応、5-オキサゾロン環構造の形成反応が副次的に起こるまでには至らない。更には、上述するパーフルオロアルカン酸とアルカン酸無水物とを利用するC末端アミノ酸を逐次的に分解する工程においてすら、抑制されている種々の副次反応、例えば、ペプチド主鎖アミド結合（ $-\text{CONH}-$ ）の開裂は、かかるアルカン酸無水物のみを利用する前処理工程においては、なお一層の抑制がなされている。

一方、上記のゲルの再膨潤を起こさせる双極性非プロトン性溶媒は、該ゲル状物質内に浸潤でき、膨潤状態に維持可能である、比較的分子サイズが小さく、かつ、ゲル状物質に対する親和性に優れた有機溶媒が好ましい。加えて、上述するN-アルカノイル化、O-アルカノイル化の反応過程において、アルカン酸無水物の分子内分極を誘起可能な、高い双極性を示すとともに、反応副生成物であるアルカン酸に対して、優れた溶媒であることが好ましい。なお、上記反応温度において、揮発・蒸散することの少ない双極性非プロトン性溶媒が、より好ましく、例えば、ホルムアミド（ HCONH_2 ）などは、ポリアクリルアミド・ゲルを用いる際、以上に述べた要件全てを十分に満足するものである。

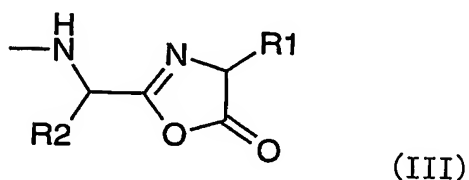
所定の反応時間が経過した時点で、ゲル担体中のアルカン酸無水物を除去して、反応を停止するため、該ゲル状物質の溶解を引き起こさず、かつ、アルカン酸無水物、ならびに双極性非プロトン性溶媒に対して親和性を有する極性非プロトン性溶媒を用いて、ゲル担体全体を洗浄する。すなわち、該極性非プロトン性溶媒による洗浄により、ゲル担体中に浸潤していたアルカン酸無水物、双極性非プロトン性溶媒は、拡散によって、希釈、除去される。例えば、ポリアクリルアミド・ゲルを用いる際、上述する洗浄用途に適する要件を満足する極性非プロトン性溶媒としては、アセトニトリル（ CH_3CN ）などの炭素数4

以下のニトリル類、アセトンなどの炭素数4以下のケトン類などを挙げることができる。通常、この希釈、洗浄に利用する極性非プロトン性溶媒として、上述する脱水処理工程で使用する極性非プロトン性溶媒を利用することが好ましい。また、これら洗浄処理に利用する極性非プロトン性溶媒は、水よりも蒸散し易く、蒸散・乾固すると、嵩体積が減少し、収縮したゲル担体となる。

本発明の第二の形態における、C末端アミノ酸の逐次的な分解工程も、通常、水分を含まず、収縮したゲル担体に対して、反応試薬溶液を浸潤させて、反応を開始させる形態をとるため、N-アシル化保護の前処理を施した後、該ゲル担体上に担持された状態の対象とするペプチド試料に対して、30℃～80℃の範囲に選択される温度において、

該ゲル状物質内に浸潤でき、膨潤状態に維持可能である、双極性非プロトン性溶媒中に、パーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる比率で溶解してなる混合溶液を用いて、該混合溶液中に該ゲル担体を浸漬することにより、担持された状態の対象とするペプチド試料にアルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸とを作用させ、

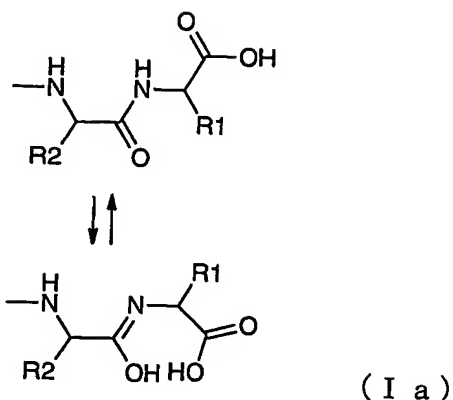
ペプチドのC末端において、下記する一般式 (III) :



(式中、

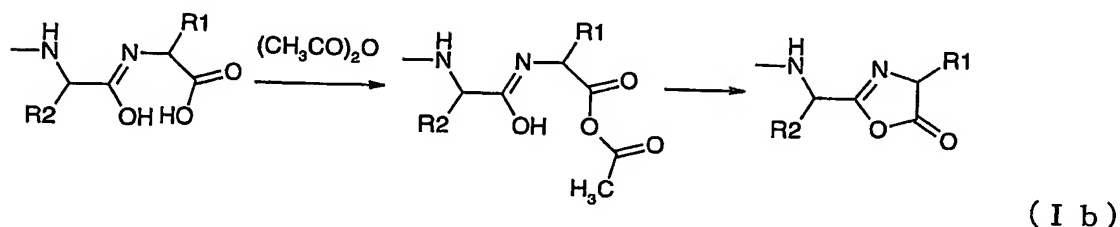
R1は、ペプチドのC末端アミノ酸の側鎖を表し、
R2は、前記C末端アミノ酸の直前に位置するアミノ酸残基の側鎖を表す) で表記される5-オキサゾロン構造を経て、該5-オキサゾロン環の開裂に伴いC末端アミノ酸の逐次的分解を行う。

このパーフルオロアルカン酸とアルカン酸無水物とを利用する、5-オキサゾロン環形成の反応は、先ず、下記する反応式 (I a) :



で示されるケト-エノール互換異性化の過程において、ゲル担体の穴中に担持されているペプチド鎖に、パーフルオロアルカン酸をプロトン供与体として機能させることで、エノール型をとる比率を高めている。

- 5 次いで、このエノール型に対して、C末端カルボキシ基の活性化を行い試薬として、アルカン酸無水物を利用し、そのC末端カルボキシ基を、例えば、下記の反応式 (I b) :



- 10 で例示されるような、非対称型酸無水物へと変換し、活性化されたC末端カルボキシ基と、エノール型のヒドロキシ基との反応などが、5-オキサゾロン環形成の促進に関与している。双極性非プロトン性溶媒中には、アルカン酸無水物は、パーフルオロアルカン酸と比較して、高い濃度で含有させておくことで、かかる反応は、穏和な温度条件で進行でき、反応温度を30℃～80℃の範囲
- 15 に選択することが可能となっている。

一方、本発明の第二の形態でも、パーフルオロアルカン酸の触媒作用は、そのプロトン供与能を利用するものであり、該パーフルオロアルカン酸の示す pK_a は、0.3～2.5の範囲であるパーフルオロアルカン酸を用いることが好ましい。なお、前記の反応温度において、利用する双極性非プロトン性溶媒

中に均一に溶解可能な、炭素数 2～4 のパーフルオロアルカン酸は、より適するものであり、さらには、直鎖状の炭素数 2～4 のパーフルオロアルカン酸が、より適するものであり、具体的には、トリフルオロ酢酸 (CF_3COOH)、ペンタフルオロプロパン酸 ($\text{CF}_3\text{CF}_2\text{COOH}$)、ヘプタフルオロブタン酸 ($\text{F}_3\text{CF}_2\text{CF}_2\text{COOH}$) を利用することがより望ましい。

また、C末端カルボキシ基の活性化に利用されるアルカン酸無水物は、反応温度まで昇温した際、適正な反応性を与えるものが好ましく、従って、炭素数 2～4 のアルカン酸の対称型酸無水物を用いることが好ましい。なかでも、前記対称型酸無水物として、炭素数 2～4 の直鎖アルカン酸の対称型酸無水物を用いることがより好ましく、特に、炭素数 2 の直鎖アルカン酸の対称型酸無水物、すなわち、無水酢酸が好適に利用できる。かかるアルカン酸無水物は、C末端カルボキシ基の活性化を図り、さらに、5-オキサゾロン環形成に適する配置を採る上で、その配向における立体障害を生じることの少ないものが好ましく、その点でも、無水酢酸を利用するとより好適である。

また、上記する活性化試薬として利用される、アルカン酸無水物は、反応に従って、消費されるため、予め、ゲルの膨潤に利用する双極性非プロトン性溶媒中に、ペプチドとの反応に消費される量に対して、大過剰量を溶解しておき、その濃度低下を抑制することが望ましい。具体的には、ゲルの膨潤に用いる混合溶液中において、アルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸との含有比率は、アルカン酸無水物 100 容当たり、パーフルオロアルカン酸 1～20 容の範囲に選択し、その際、双極性非プロトン性溶媒中における、アルカン酸無水物の含有濃度は、10～30% (体積%) の範囲に選択することがより望ましい。反応時間は、反応温度、双極性非プロトン性溶媒中に含有されるアルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸の含有濃度に依存し、加えて、極性非プロトン性溶媒を利用する脱水処理に伴って、収縮したゲル担体の膨潤に要する時間をも考慮して、適宜選択することが望ましい。例えば、ポリアクリルアミド・ゲル (12.5 質量%) に対して、上述のアセトニトリルを利用して脱水処理を施した後、後述のホルムアミドなどの双極性非プロトン性溶媒中に浸漬して、

ゲル担体の再膨潤を達成するに要する時間は、例えば、40℃では、3時間程度であるため、全体の反応時間は、かかるゲル担体の再膨潤を終えた後、所望のアミノ酸残基数、C末端アミノ酸の選択的な分解を達成するに要する時間を加えたものを選択する。

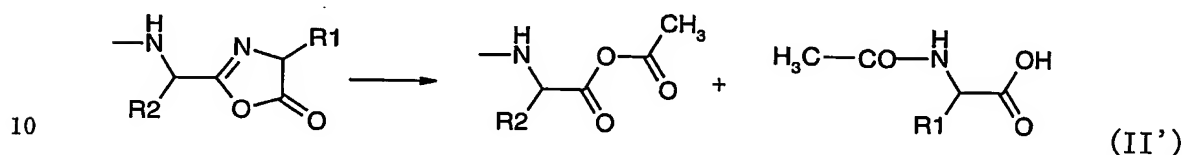
- 5 一方、上記のゲルの再膨潤を起こさせる双極性非プロトン性溶媒は、該ゲル状物質内に浸潤でき、膨潤状態に維持可能である、比較的分子サイズが小さく、かつ、ゲル状物質に対する親和性に優れた有機溶媒が好ましい。加えて、上述する式(I a)のケト-エノール互換異性化の過程において、そのエノール体の比率を維持可能な、高い双極性を示すとともに、溶質分子のアルカン酸無水物、パーフルオロアルカン酸、ならびに、反応副生成物であるアルカン酸
10 に対して、優れた溶媒であることが好ましい。なお、上記反応温度において、揮発・蒸散することの少ない双極性非プロトン性溶媒が、より好ましく、例えば、ホルムアミド(HCONH_2)などは、ポリアクリルアミド・ゲルを用いる際、以上に述べた要件全てを十分に満足するものである。

- 15 なお、上述するアルカン酸無水物、パーフルオロアルカン酸、ならびに、反応副生成物であるアルカン酸に対して、優れた溶解性をもたらす双極性非プロトン性溶媒は、水分子をも容易に溶解することが可能である。従って、前記双極性非プロトン性溶媒を用いる混合溶液中での反応処理に際して、前記反応系は、水分を除去した、乾燥雰囲気下に保たれることが好ましい。すなわち、上記の式(I b)に示される反応中間体、非対称型酸無水物へと変換し、活性化されたC末端カルボキシ基は、反応系内に水分子が混入すると、加水分解を受け、元の末端カルボキシ基へと戻ってしまう。かかる不活性化過程を回避するため、反応系は、水分を除去した状態を維持することが好ましい。

- 25 例えば、対象とするペプチドを構成するアミノ酸残基のうち、メチオニンに存在するイオウが、系内に混入する酸素により酸化を受け、その式量が増加することもある。この酸素による酸化を防止することは、分子量の測定を基礎とする本発明の方法においては、かかる酸化を抑制することは、より高い確度を達成する上で、より好ましいものとなる。

例えば、反応系を、水分に加えて、酸素も除去された乾燥雰囲気下に保つ手段としては、反応を行う系を気密状態とし、系外からの、水分、酸素の浸入を防止するとともに、液の注入、排出操作も、乾燥処理した不活性気体、例えば、窒素雰囲気下で行うことが望ましい。あるいは、酸化防止効果を有する D T T
 5 などの還元性のスルファニル基 (—SH) を含む化合物を利用して、酸化を回避することが望ましい。

また、本発明の第二の形態においても、一旦形成された 5-オキサゾロン環から、例えば、反応式 (II') で表記される反応：



等の反応を経て、C末端のアミノ酸の離脱と、次段の反応中間体の形成を進行して、逐次的なC末端アミノ酸の選択的な分解が進むと推断される。従って、かかる反応を終えた後、得られる反応産物は、上述する反応式 (II) に示される、C末端にカルボキシ基が表出されているもの以外に、中間産物である 5-
 15 オキサゾロン環構造に留まるもの、あるいは、反応中間体の一形態として、C末端が非対称型酸無水物に至ったものも混入したものとなる。

かかる逐次的なC末端アミノ酸の分解反応は、少なくとも、反応式 (I b) で例示される 5-オキサゾロン環構造の形成過程と、反応式 (II') で例示される 5-オキサゾロン環構造の開裂による末端アミノ酸の分離過程との二段階の
 20 素反応から構成される。そのため、全体の反応速度は、これら各過程の反応速度の双方に依存するものの、主に、利用するアルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸の濃度ならびに反応温度に依存している。加えて、一連の反応産物は、逐次的な反応で形成されるため、得られる一連の反応産物において達成される、短縮されるC末端アミノ酸配列の最大長は、処理時間が長くなるととも
 25 に、延長される。従って、かかる逐次的なC末端アミノ酸の選択的な分解処理工程における処理時間は、主に、利用するアルカン酸無水物とパーフルオロア

ルカン酸の濃度ならびに反応温度に応じて、また、解析すべきC末端アミノ酸配列の目標とするアミノ酸長をも考慮して、適宜選択するものである。

逐次的なC末端アミノ酸の選択的な分解反応の停止は、反応系の温度を低下するとともに、ゲル担体中に浸潤している反応試薬、すなわち、パーフルオロアルカン酸とアルカン酸無水物を希釈・除去することで行う。具体的には、C末端アミノ酸の逐次的分解反応に利用した混合溶液を、該ゲル状物質の溶解を引き起こさず、かつ、前記パーフルオロアルカン酸とアルカン酸無水物、ならびに双極性非プロトン性溶媒に対して親和性を有する極性非プロトン性溶媒を用いて、希釈除去することにより、分解反応の停止と反応試薬の除去を行う。

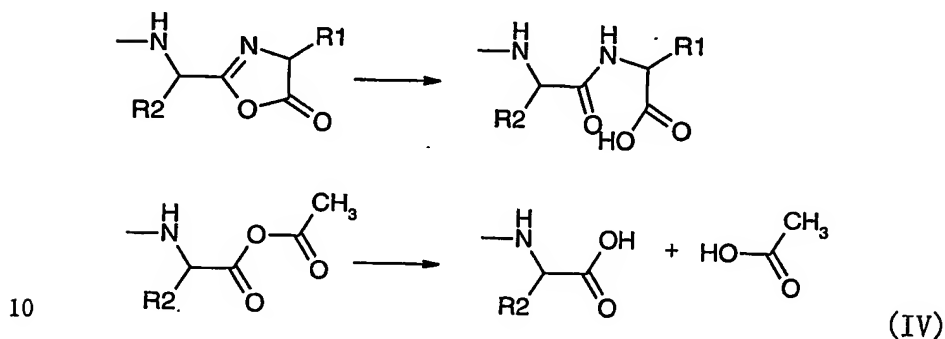
5 なお、かかる反応試薬の希釈・除去に、混合溶液の調製に利用する双極性非プロトン性溶媒を利用することも可能であるが、反応式(I b)で例示される5-オキサゾロン環構造の形成過程を停止する上では、エノール型中間体の安定化に寄与の少ない極性非プロトン性溶媒を利用する、パーフルオロアルカン酸とアルカン酸無水物、ならびに双極性非プロトン性溶媒の除去工程とすることがより望ましい。少なくとも、反応試薬の希釈・除去工程の最終段では、極性非プロトン性溶媒を利用する希釈・除去の操作を設ける。例えば、ポリアクリルアミド・ゲルを用いる際、これらの条件を満足する極性非プロトン性溶媒としては、アセトニトリル(CH_3CN)などの炭素数4以下のニトリル類、アセトンなどの炭素数4以下のケトン類などを挙げることができる。

10 本発明の第二の形態では、前記C末端アミノ酸を逐次的に分解する反応で得られる一連の反応生成物に対する加水処理を行う、後処理工程も、これら一連の反応生成物を含むペプチド混合物を、該ゲル担体上に担持された状態としたまま、実施する。すなわち、C末端アミノ酸を逐次的に分解する反応で得られる一連の反応生成物を含む混合物に対して、該ゲル担体上に担持された状態の

15 まま、

塩基性含窒素芳香環化合物または第三アミン化合物を溶解する水溶液を利用し、該水溶液中にゲル担体を浸漬することにより、前記塩基性の窒素含有有機化合物の共存下、前記反応生成物ペプチドに水分子を作用させ、加水処理を施す。

この加水処理において、塩基性含窒素芳香環化合物または第三アミン化合物は、反応式 (II') に示される 5-オキサゾロン環構造、ならびに、次段の反応中間体 (酸無水物体) の加水分解反応を触媒するものの、それ自体が、5-オキサゾロン環構造または反応中間体 (酸無水物体) と反応して、不要な副生物を生じることがなく、好適な塩基触媒として機能する。具体的には、反応式 (II') に示される 5-オキサゾロン環構造、ならびに、次段の反応中間体 (酸無水物体) の加水分解反応では、下記反応式 (IV) に示すように、反応産物のペプチド鎖の C 末端にカルボキシ基が表出する。



上記の加水処理に利用する、塩基性含窒素芳香環化合物または第三アミン化合物は、例えば、残留している C 末端が非対称型酸無水物に至ったものと反応して、アミド結合を形成することがなく、また、水溶液とした際、均一な溶液とできるので、好ましいものである。利用可能な、塩基性含窒素芳香環化合物としては、極性非プロトン性溶媒に高い溶解性を示す、単環式の含窒素芳香環化合物が好ましく、例えば、ピリジンはより好適に利用できる。また、利用可能な第三アミン化合物は、前記ピリジン塩基が示す比較的弱い塩基性と同程度の塩基性を有するものが好ましく、例えば、DMAE ((CH₃)₂N-CH₂-CH₂-OH) などが好適に利用できる。例えば、ピリジンを利用する際には、水溶液全体の体積に対して、ピリジンを、5～15 体積%の範囲、より具体的には、10 体積%に選択することが好ましい。また、(ジメチルアミノ) エタノール (DMAE) を利用する際には、水溶液全体の体積に対して、DMAE を、1～20 体積%の範囲、より具体的には、10 体積%に選択することが好まし

い。

これら単環式の含窒素芳香環化合物や第三アミン化合物は、水溶液として、上記反応産物を担持しているゲルに作用させる。この後処理においては、親水性に富むゲル状物質中に、かかる有機塩基を含有する水溶液は、速やかに浸潤する。なお、速やかに加水反応を完了するためには、反応温度を60℃以上を選択することが好ましいが、一般に、密閉された反応容器内でかかる反応を行うため、反応容器内の機械的強度を考慮すると、100℃以下の範囲に選択することが望ましい。

この有機塩基を含有する水溶液を用いた加水処理は、反応産物のペプチド鎖のC末端にカルボキシ基を表出させることを主な目的としているが、その条件は、前処理工程でなされたO-アシル化保護の脱保護も同時に進行するが、一方、N末端のアミノ基、ならびに、リシン残基側鎖上のアミノ基に対するN-アシル化保護では、脱保護が進行しないように選択されている。

なお、加水処理に利用する塩基性含窒素芳香環化合物または第三アミン化合物が残余すると、反応産物の表出したC末端にカルボキシ基に対して、かかる窒素塩基が付加塩を形成したものが混在する状態となるため、ゲル担体中に含まれる水溶液を、該ゲル状物質の溶解を引き起こさず、かつ、水に対して親和性を有する極性非プロトン性溶媒を用いて、希釈除去することにより、該ゲル担体の再脱水処理を施すとともに、加水処理に利用する塩基性含窒素芳香環化合物または第三アミン化合物を水とともに、希釈除去することが好ましい。従って、この再脱水処理の工程において利用する極性非プロトン性溶媒は、塩基性含窒素芳香環化合物または第三アミン化合物に対しても、高い溶解性を有するものがより好ましい。例えば、ポリアクリルアミド・ゲルを用いる際、これらの条件を満足する、再脱水処理工程用の極性非プロトン性溶媒としては、アセトニトリル (CH_3CN) などの炭素数4以下のニトリル類、アセトンなどの炭素数4以下のケトン類などを挙げることができる。

加えて、上述する加水処理は、C末端アミノ酸の逐次的分解反応の後、一旦、反応試薬のアルカン酸無水物ならびにパーフルオロアルカン酸に対する、極性

非プロトン性溶媒を利用する希釈・除去の操作を終えた後に実施するだけでなく、C末端アミノ酸の逐次的分解反応と該加水処理とを、連続して実施することも可能である。具体的には、C末端アミノ酸の逐次的分解反応は、その反応温度を下げて、その反応停止を図りつつ、有機塩基を含有する水溶液を加えると、アルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸の組み合わせてなる反応試薬
5 の不活化、ゲル中からの溶出が生じ、C末端アミノ酸の逐次的分解反応の停止と、反応試薬の不活化・除去がなされる。引き続き、反応産物に対する加水処理も行うことができ、最終的に、極性非プロトン性溶媒を利用する再脱水処理工程を施すことで、有機塩基を含有する水溶液とともに、アルカン酸無水物に
10 対応するアルカン酸とパーフルオロアルカン酸、双極性非プロトン性溶媒の除去と、再脱水がなされるため、一旦極性非プロトン性溶媒を利用する洗浄・除去操作を中間に設ける際と、実質的に差異を持たないものとなる。

既に説明した本発明の第一の形態と同じく、本発明の第二の形態においても、C末端アミノ酸の逐次的分解に伴う分子量減少を測定する工程では、トリプシン消化処理を施して、アミノ酸長の長いペプチド鎖を断片化して、回収された
15 該トリプシン消化処理済みペプチド断片を含む乾燥混合物について、MALDI-TOF-MS法を利用し、該イオン化処理で生じる陽イオン種による分子量測定、ならびに陰イオン種による分子量測定を行う。

その際、本発明の第二の形態における特徴の一つは、前記加水処理済みの一連の反応生成物を含む混合物に対して、再脱水処理後、該ゲル担体上に担持された状態で、かかるトリプシン消化処理の工程を行う点にある。具体的には、再脱水処理後、前記加水処理済みの一連の反応生成物を含む混合物に対して、

該ゲル担体上に担持された状態で、緩衝溶液中に溶解するトリプシンを作用させ、該ペプチド鎖のN末端のアミノ基ならびに、該ペプチド鎖に含有されて
25 いる可能性のあるリシン残基側鎖のアミノ基に対する上記N-アシル化保護が保持されている、該ペプチド鎖のトリプシン酵素特異的な消化処理を施して、該ペプチド鎖中に存在するアルギニン残基のC末側ペプチド結合の選択的な切断によるペプチド断片化を行っている。

そもそも、二次元電気泳動法やSDS-PAGE法などの、ゲル電気泳動法による分子量分離に利用するゲル担体は、一定範囲以上のアミノ酸長を有するペプチド鎖は、そのゲル内の穴構造に保持する機能を有し、電気泳動速度に明確な差異を与えるものの、ペプチド鎖のアミノ酸長が、かかる閾値分子量より
5 小さくなると、ゲル内の穴構造中に保持する機能は急速に失われる。本発明の第二の形態では、このゲル電気泳動に利用されるゲル担体の特異性を利用して、アミノ酸長の長いペプチド鎖を、そのゲル担体上に担持された状態を維持したまま、C末端アミノ酸を逐次的に分解除去し、一連の反応産物を調製する工程を行った後、トリプシン消化処理によってペプチドの断片化を行うことで、目的とする一群のC末端側ペプチド断片を、容易にゲル担体から溶出させ、回収
10 することを可能としている。

本発明の第二の形態でも、このトリプシン消化処理を行う際、前記加水処理済みの一連の反応生成物を含む混合物では、該ペプチド鎖のN末端のアミノ基ならびに、該ペプチド鎖に含有されている可能性のあるリシン残基側鎖のアミ
15 ノ基に対するN-アシル化保護が保持されているので、N-アシル化保護リシン残基のC末側ペプチド結合の切断は生じず、該ペプチド鎖中に存在するアルギニン残基のC末側ペプチド結合の選択的な切断が起こる。既に説明した通り、該ペプチド鎖中に存在するアルギニン残基のC末側ペプチド結合の選択的な切断を行うと、アミノ酸長の長いペプチド鎖から、複数個のペプチド断片が生成
20 し、その際、目的とする一群のC末端側ペプチド断片は、通常、元のペプチド鎖の、数分の1のアミノ酸長となるため、ゲル担体から遊離し、トリプシン溶液中に溶出する。勿論、トリプシン溶液中には、その他のペプチド断片も、同じように溶出するが、緩衝溶液とゲル担体とを分離すると、遊離した種々のペプチド断片は、緩衝溶液中に回収される。その後、脱塩処理を施し、前記緩衝
25 溶液成分を除去して、該トリプシン消化処理済みペプチド断片を回収し、乾燥する。

これ以降の工程、すなわち、回収された該トリプシン消化処理済みペプチド断片を含む乾燥混合物について、MALDI-TOF-MS法を利用して、分

子量測定、その測定結果に基づく、C末端アミノ酸配列の決定までの操作は、上述する本発明の第一の形態と同じである。

すなわち、本発明の第二の形態にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法は、多種のタンパク質を含む試料中から、例えば、二次元電気泳動法やS
5 D S - P A G E法などの、ゲル電気泳動法によって分離されたタンパク質に関しては、そのおおよその分子量は推定できており、仮に、分離されたスポット
(又は、バンド) からかかるタンパク質を単離回収しても、そのアミノ酸数が大きく、上述する、本発明の第一の形態にかかる手法を利用して、一群のC末端側ペプチド断片とした上で、分子量測定、その測定結果に基づく、C末端ア
10 ミノ酸配列の決定までの操作を行う必要のある場合に、予め、分離されたスポット (又は、バンド) からかかるタンパク質を単離回収する代わりに、分離されたスポット (又は、バンド) 部のゲル担体を切り出し、ゲル担体上に保持した状態で、一連の化学的処理を行うものである。予め、分離されたスポット (又は、バンド) からかかるタンパク質を単離回収する操作を省くことができ、し
15 かも、単離回収工程における回収収率に影響されることなく、同等の確度で、C末端アミノ酸配列の決定を実施することが可能である。

なお、本発明の第二の形態にかかる方法を適用する際、対象とするペプチド試料は、鎖状ペプチドとし、予めゲル電気泳動法による分離を行い、該ゲル担体上に担持された状態の単一スポットとするが、該ゲル電気泳動法は、一次元
20 方向に電気泳動をなす従来のS D S - P A G E法は勿論のこと、ゲル上で二次元的に泳動を行い、より高い分離を行う、二次元泳動法を適用したものでもよい。かかる二次元泳動法を適用して、分離されるペプチド試料は、夾雑物の混入がなく、より少ないサンプル量であっても、本発明の第二の形態にかかる方法によって、そのC末端アミノ酸配列決定が可能となる。また、予めゲル電気
25 泳動法による分離を行う場合、対象とするペプチド中に、分子内におけるシステイン残基相互間で-S-S-結合を形成するものは、2-スルファニルエタノール ($\text{HS}-\text{C}_2\text{H}_4-\text{OH}$: 2-メルカプトエタノール)、D T T (ジチオトレイトール: トレオール, 4-ジスルファニル-2, 3-ブタンジオール) な

- どの還元性試薬を添加して、還元状態で電気泳動を行い、単一のスポット化を行うことが好ましい。あるいは、予め、分子内におけるシステイン残基相互間での-S-S-結合を還元し、さらには、還元型のシステインに対して、ヨード酢酸などを用いたカルボキシメチル化などの修飾を施し、単一のスポット化
- 5 行うことが好ましい。このように、分子内におけるシステイン残基相互間での-S-S-結合を形成してなく、鎖状ペプチドとすることで、トリプシン消化もより効率的になされる。

実施例

- 10 以下に、実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明する。なお、かかる実施例は、本発明にかかる最良の実施形態の一例ではあるものの、本発明はかかる具体例の形態により限定を受けるものではない。

(実施例 1)

- 本発明の第一の形態にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法の有用性を検証する目的で、153アミノ酸からなるヘムタンパク質、ウマ由来のミ
- 15 オグロビンについて、そのタンパク質部分グロビン・ペプチド鎖のC末端アミノ酸配列の解析を行った。

- 本実施例で利用する、解析対象試料となるウマ・ミオグロビンのグロビン・ペプチド鎖が有するアミノ酸配列は既に判明しており、本発明にかかる解析方法で特定されるC末端アミノ酸配列の特定精度を検証した。図1に、本実施例
- 20 1におけるC末端アミノ酸の逐次的な分解工程の工程フローを示す。

(単離、乾燥ペプチド粉末試料の調製)

- 先ず、市販されているウマ・ミオグロビン標品について、 $1.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ の濃度でグロビン・ペプチド鎖部分のみを含有するペプチド溶液を調製する。
- 25 前記ペプチド溶液を試験管に採り、凍結乾燥して、乾燥ペプチド粉末試料を調製する。

(前処理操作)

次いで、この乾燥ペプチド試料を収納したバイアルを、テフロン製コックバ

ルブ封止される真空排気用のポートを具えた、共栓付き気密試験管型のガラス製反応容器内に装着し、このガラス製反応容器内に別途、下記する液状試薬を所定量入れる。前処理用の試薬として、酢酸を5体積%添加した無水酢酸（300 μ L）を用い、前記ガラス製反応容器内に乾燥ペプチド試料を収納したバイアルを収納した後、冷却下、反応容器内を真空排気し、気密状態に封止する。

この気密状態の反応容器全体を、50℃、2時間保温して、容器内の液状試薬から供給される、蒸気状の無水酢酸と酢酸を、乾燥ペプチド試料に作用させる。このアシル化試薬として、無水酢酸を酢酸共存下で、乾燥ペプチド試料に作用させることで、ペプチドのN末端アミノ基に選択的なアセチル化反応が進行する。加えて、ペプチド鎖内に含有される、リシン残基（ $-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)-\text{CO}-$ ）の ϵ 位のアミノ基へのN-アセチル化、同時に、セリン残基（ $-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-\text{CO}-$ ）やトレオニン残基（ $-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH})-\text{CO}-$ ）に存在するヒドロキシ基に対するO-アセチル化、チロシン残基（ $-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH})-\text{CO}-$ ）のフェノール性ヒドロキシ基へのO-アセチル化がなされる。

かかる前処理を終えた後、反応容器内に残留する、未反応の無水酢酸や酢酸等を減圧留去するとともに、得られる保護・修飾されたグロビン・ペプチド鎖の乾燥を行う。

（C末端アミノ酸分解除去反応の操作）

次いで、得られるアセチル基による修飾・保護を施したグロビン・ペプチド鎖を保持しているバイアルを、同じく共栓付き気密試験管型のガラス製反応容器内に装着した状態で、このガラス製反応容器内に別途、下記する液状試薬を所定量入れる。

このC末端アミノ酸の選択的分解反応用の液状試薬として、ヘプタフルオロブタン酸（HFBA： $\text{C}_3\text{F}_7\text{COOH}$ ）を1体積%添加した無水酢酸（300 μ L）を用い、前記ガラス製反応容器内に乾燥試料を収納したバイアルを収納した後、冷却下、反応容器内を真空排気し、気密状態に封止する。

この気密状態の反応容器全体を、40℃、3時間保温して、容器内の液状試

薬から供給される、蒸気状の無水酢酸とHFB Aを、乾燥ペプチド試料に作用させる。その間、ペプチド鎖C末端に対して、HFB Aと無水酢酸とを前記加熱温度で作用させることで、上述する反応式(I a) ~ (II')の反応経路を経て、ペプチド鎖のC末端アミノ酸の逐次的分解反応が進行する。その際、かかる反応産物のペプチド鎖C末端は、上述する5-オキサゾロン環あるいは、カルボキシ基の活性化が図られた非対称型酸無水物の形態となっている。

かかるC末端アミノ酸の選択的分解処理を終えた後、反応容器内に残留する、未反応の無水酢酸やHFB A等を減圧留去するとともに、残余するアセチル化保護・修飾されたグロビン・ペプチド鎖と得られる反応産物との混合物の乾燥を行う。

(後処理操作)

次いで、反応産物が含まれる混合物の乾燥試料を保持しているバイアルを、同じく共栓付き気密試験管型のガラス製反応容器内に装着した状態で、このガラス製反応容器内に別途、下記する液状試薬を所定量入れる。

この後処理は、主に、前記混合物中では、反応産物ペプチドのC末端は、カルボキシ基に変換されたもの以外に、5-オキサゾロン構造に留まったもの、あるいは、非対称型酸無水物への変換まで進行したものも、含まれた混合物状態となっているため、これらに加水処理を施し、ペプチドのC末端は、カルボキシ基となった状態へと変換する処理である。すなわち、後処理用の液状試薬として、DMAEを10体積%溶解した水溶液(300 μ L)を用い、前記ガラス製反応容器内に乾燥試料を収納したバイアルを収納した後、冷却下、反応容器内を真空排気し、気密状態に封止する。

この気密状態の反応容器全体を、60℃、1時間加熱して、容器内の液状試薬から供給される、蒸気状のDMAEと水分子を、乾燥試料に作用させる。非対称型酸無水物ならびに5-オキサゾロン構造は、有機塩基であるDMAEの共存下、水分子を作用することで、加水がなされ、上述する反応式(IV)に示すように、C末端にカルボキシ基を有する形状に変換される。加えて、アセチル基による修飾・保護を施したペプチド鎖上、セリン残基($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2$

OH) - CO-) やトレオニン残基 ($-NH-CH(CH_3)OH-CO-$) に存在するヒドロキシ基に対するO-アセチル化保護は加水分解され、脱保護がなされ、また、チロシン残基 ($-NH-CH(CH_2-C_6H_4-OH)-CO-$) のフェノール性ヒドロキシ基へのO-アセチル化保護の加水分解も

5 ほぼ全て進む。但し、用いる有機塩基の塩基性は高くないため、N-アセチル化保護の脱保護は進まず、最終的に後処理工程後には、より高い選択性を持って、N末端のアミノ基に対するN-アセチル化、リシン残基 ($-NH-CH(CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2)-CO-$) の ϵ 位のアミノ基へのN-アセチル化が残るものとなる。場合によっては、チロシン残基 ($-NH-CH(CH_2-C_6H_4-OH)-CO-$) のフェノール性ヒドロキシ基へのO-アセチル化が僅かに

10 残るものとなる。

かかる後処理を終えた後、反応容器内に残留する、残余している水分子やDMAE等を減圧留去するとともに、後処理済み反応産物の混合物の乾燥を行う。

(トリプシン消化によるペプチド断片化)

15 ウマ・ミオグロビンのグロビン・ペプチド鎖は、153アミノ酸からなるため、質量分析における、適正な分子量範囲を逸脱しており、トリプシン消化によるペプチド断片化処理を行う。

具体的には、前記後処理済み反応産物の混合物を乾燥した試料を容器内に入れ、トリプシン含有水性溶液を加え、ペプチド鎖の断片化を行う。前記トリプ

20 シン含有水性溶液は、3-ピリジン酢酸緩衝液 (pH 7) 中に、トリプシンを $0.1 \mu g / \mu L$ の濃度で含有しており、トリプシン消化は、37℃で、攪拌しつつ、8時間酵素反応を行う。

なお、元のペプチド鎖、反応産物は、前記後処理工程における脱保護によっても、N末端のアミノ基に対するN-アセチル化、リシン残基 ($-NH-CH(CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2)-CO-$) の ϵ 位のアミノ基へのN-アセチル

25 化は保持された状態であり、トリプシン消化によっては、前記N-アセチル化リシン残基のC末側ペプチド結合の切断はなされず、アルギニン残基のC末側ペプチド結合切断のみが進行する。このウマ・ミオグロビンのグロビン・ペプ

チド鎖が有するアミノ酸配列は既に判明しており、図 7 に示す、153 アミノ酸からなる元のペプチド鎖は、アルギニン残基におけるトリプシン消化を受けると、1-31、32-139、140-153 の各部分アミノ酸配列を含む断片が生じる。従って、上述する C 末端アミノ酸の逐次的分解処理で生成される一連の反応産物は、前記 140-153 アミノ酸の部分アミノ酸配列を含む C 末断片とともに、各 C 末端アミノ酸に相当する分子量差を示す、一連の質量分析ピークを与える。

トリプシン消化後、反応液は、Zip Tip を利用して、脱塩処理、ならびに、ペプチド断片の分離・回収を行った後、これらペプチド断片の凍結乾燥を行う。

(後処理、トリプシン消化によるペプチド断片化済みの反応産物の特定)

以上の一連の処理を施して得られる、後処理、ペプチド断片化済みの反応産物とグロビン・ペプチド鎖の C 末断片との混合物について、質量分析法により、含有される各ペプチド断片の分子量の測定を行う。

本実施例では、乾燥したペプチド断片混合物試料に対して、MALDI-TOF-MS 装置を利用し、各ペプチド断片の分子量を反映する主イオン種ピークの質量と、その相対的な信号強度の測定、比較を行う。なお、かかる MALDI-TOF-MS 装置を利用する測定では、イオン種の分別は、負帯電イオン種を検出器へ導く、所謂ネガティブ・モードの測定と、正帯電イオン種を検出器へ導く、所謂ポジティブ・モードの測定との双方を行う。すなわち、各ペプチド断片の分子量を反映する主イオン種として、ポジティブ・モードの測定において、プロトン (H^+) が付加された陽イオン種、ネガティブ・モードの測定において、プロトン (H^+) が離脱した陰イオン種の、対応する二種のスペクトルを得る。

図 3 に示すポジティブ・モードの測定と、図 4 に示すネガティブ・モードの測定とを対比すると、ウマ・ミオグロビンのグロビン・ペプチド鎖に由来するトリプシン消化断片に相当する主な二つのピークとして、1-31 の部分アミノ酸配列、ならびに、140-153 の部分アミノ酸配列を含む断片が、かか

る分子量範囲に見出される。図 3 に示すポジティブ・モードの測定において、その強度は相対的に大きなピークは、C 末端にアルギニン残基を有する 1-31 の部分アミノ酸配列の N 末側ペプチド断片に相当し、一方、図 4 に示すネガティブ・モードの測定において、その強度は相対的に大きなピークは、アルギニン残基を含まない 140-153 の部分アミノ酸配列の C 末側ペプチド断片に相当すると判定される。加えて、32-139 の部分アミノ酸配列中、N-アセチル基の離脱されたリシン残基における切断で派生する 78-102 の部分アミノ酸配列に相当するペプチド断片も見出され、同じく、図 3 に示すポジティブ・モードの測定において、その強度は相対的に大きなピークを示している。その他、トリプシンの自己消化で生じるペプチド断片も、かかる分子量範囲で見出され、同じく、図 3 に示すポジティブ・モードの測定において、その強度は相対的に大きなピークを示している。

図 4 に示すネガティブ・モードの測定では、140-153 の部分アミノ酸配列の C 末側ペプチド断片に加えて、C 末端アミノ酸の逐次的分解処理を施した反応産物に由来する一連の C 末側ペプチド断片も、その強度は相対的に大きく測定されている。表 1 に、測定されたピークの質量値、元のグロビン・ペプチド鎖の C 末断片に起因するピークの質量値との差異、ならびに、それから特定される、各反応産物断片において除去されているアミノ酸、および、各反応産物の形態を示す。

表 1

| m/Z | Δm | 帰属 | 対応ペプチド構造 |
|----------------|---------------|------------------|-----------------------------------|
| 1636.58 | — | | <u>NDIAAK (Ac) YK (Ac) ELGFQG</u> |
| 1578.55 | 58.03 | —Gly | <u>NDIAAK (Ac) YK (Ac) ELGFQ</u> |
| 1449.58 | 187.00 | —Gln-Gly | <u>NDIAAK (Ac) YK (Ac) ELGF</u> |
| <u>1302.58</u> | <u>334.00</u> | —Phe-Gln-Gly | <u>NDIAAK (Ac) YK (Ac) ELG</u> |
| 1245.74 | 390.84 | —Gly-Phe-Gln-Gly | <u>NDIAAK (Ac) YK (Ac) EL</u> |

本実施例 1 の蒸気状の試薬を利用する処理法では、C末端アミノ酸の逐次的分解処理により、C末端から 4 アミノ酸；グリシン、グルタミン、フェニルアラニン、グリシンの除去された一連の反応産物が得られている。なお、図 4 に示すネガティブ・モードの測定には、前記 1 4 0－1 5 3 アミノ酸の部分アミノ酸配列を含む C 末端ペプチド断片等のピーク以外に、トリプシン消化により派生するペプチド断片、1－3 1 アミノ酸部分、7 8－1 0 2 アミノ酸部分に相当する、二つのピーク（分子量：2 9 9 6. 1 8、3 4 8 5. 4 8）は観測されているが、7 8－1 0 2 アミノ酸部分に相当するもの以外には、リシン残基の脱保護に付随して、トリプシン消化により副生したと判定可能なペプチド断片は、かかる分子量範囲に見出されていない。従って、図 3 に示すポジティブ・モードの測定と、図 4 に示すネガティブ・モードの測定とを対比することで、トリプシン消化により派生する C 末端にアルギニン残基を有するペプチド断片と、N－アセチル化保護の脱落したリシン残基を C 末端に有するペプチド断片に対応しているイオン種は容易に判別でき、加えて、リシン残基におけるトリプシン消化を受けたペプチド断片多種が、かかる分子量範囲に混在していないため、目的とする C 末端ペプチド断片と、付随する C 末端アミノ酸の逐次的分解処理がなされている一連の C 末端ペプチド断片の弁別に際して、その作業はより容易となる。

（実施例 2）

本発明の第二の形態にかかるペプチドの C 末端アミノ酸配列解析方法の有効性を検証する目的で、ゲル担体上に担持されている 1 5 3 アミノ酸からなるヘムタンパク質、ウマ由来のミオグロビンについて、そのタンパク質部分グロビン・ペプチド鎖の C 末端アミノ酸配列の解析を行った。

本実施例では、解析対象試料となるウマ・ミオグロビンを、ポリアクリルアミド・ゲルを利用して、SDS－PAGE 法によりゲル電気泳動して、単スポットとして、そのグロビン・ペプチド鎖を分離した後、本発明にかかる解析方法で特定される C 末端アミノ酸配列の特定精度を検証した。

（ゲル電気泳動法による単離）

先ず、市販されているウマ・ミオグロビン標品について、 $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ の濃度でグロビン・ペプチド鎖部分のみを含有するペプチド溶液を調製する。なお、該、ウマ・ミオグロビンのグロビン・ペプチド鎖部分には、ヒト・ミオグロビンと異なり、システイン残基は存在しないが、仮に、ヒト・ミオグロビンなどのように、システイン残基を内在するペプチドに対しては、該システイン残基のスルファニル基 ($-\text{SH}$) の酸化による、 $-\text{S}-\text{S}-$ 結合の形成を回避するため、2-スルファニルエタノール ($\text{HS}-\text{C}_2\text{H}_4-\text{OH}$: 2-メルカプトエタノール)、DTT (ジチオトレイトール: トレオ-1, 4-ジスルファニル-2, 3-ブタンジオール) などの還元性試薬を添加するなどして、予め酸化防止処理を施す。場合によっては、予め、システイン残基のスルファニル基 ($-\text{SH}$) に対して、カルボキシメチル化などの保護を施す。

このペプチド溶液を、ゲル濃度 12.5 質量%のポリアクリルアミド・ゲル上にスポットし、泳動処理後、クーマシー・染色により、目的とするグロビン・ペプチド鎖のバンドを特定する。本例では、かかる染色バンド部のゲルを切り出し、ゲル切片を以下の一連の操作に供する。

(ゲルの脱水処理)

ゲル切片を、気密性を有するチューブ中に入れ、アセトニトリル 1 mL を注入し、15 分間攪拌する。その後、前記アセトニトリルを棄て、新たに、アセトニトリル 1 mL を注入し、更に 15 分間攪拌する。このアセトニトリルを利用する、ゲル中に含浸する水の抽出処理を、合計 3 回行い、ゲルの脱水処理を行う。脱水処理に伴い、ゲル体積の収縮が生じる。

(前処理操作)

次いで、チューブ中で、脱水処理済みのゲル切片に、10 体積%濃度の無水酢酸のホルムアミド溶液 1 mL を注入する。乾燥雰囲気下で、蜜栓したチューブを攪拌しつつ、該容器全体の温度を、 50°C に加熱し、かかる温度に、3 時間保持する。

この加熱保持の間に、当初、体積収縮しているゲルは、溶媒ホルムアミドの浸潤に従って、再膨潤し、本来の体積に復する。この再膨潤したゲル中に担持

されているグロビン・ペプチド鎖に対して、溶質の無水酢酸が、前記加熱温度で作用する結果、ペプチドのN末端アミノ基に選択的なアセチル化反応が進行する。加えて、ペプチド鎖内に含有される、リシン残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)-\text{CO}-$) の ϵ 位のアミノ基へのN-アセチル化、同時に、セリン残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-\text{CO}-$) やトレオニン残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH})-\text{CO}-$) に存在するヒドロキシ基に対するO-アセチル化、チロシン残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH})-\text{CO}-$) のフェノール性ヒドロキシ基へのO-アセチル化がなされる。

上記のN末端アミノ基のN-アセチル化、ならびに、アミノ酸残基側鎖のN-アセチル化、O-アセチル化による保護を施した後、無水酢酸のホルムアミド溶液を除去し、チューブ容器中にアセトニトリル 1 mLを注入し、15分間攪拌する。その後、前記アセトニトリルを棄て、新たに、アセトニトリル 1 mLを注入し、更に15分間攪拌する。このアセトニトリルを利用する、ゲル中に含浸するホルムアミド溶液の抽出処理を、合計3回行い、再膨潤ゲル中の脱溶媒（ホルムアミド）処理を行う。脱溶媒処理に伴い、ゲル体積の収縮が生じ、同時に、ゲルの脱水処理もなされる。

（C末端アミノ酸分解除去反応の操作）

次いで、図2に示す工程のように、前記脱水処理によって、収縮したゲルの再膨潤と、反応試薬のゲル内への浸潤を行う。具体的には、前処理操作を終えた後、得られるアセチル基による修飾・保護を施したグロビン・ペプチド鎖をゲル中に担持されている状態の、ゲル切片を入れた前記チューブ内に、ヘプタフルオロブタン酸 ($\text{HFBA} : \text{C}_3\text{F}_7\text{COOH}$) 1体積%、無水酢酸10体積%のホルムアミド溶液 1 mLを注入する。乾燥雰囲気下で、蜜栓した容器を攪拌しつつ、該容器全体の温度を、40℃に加熱し、かかる温度に、16時間保持する。

この加熱保持の間に、当初、体積収縮しているゲルは、溶媒ホルムアミドの浸潤に従って、再膨潤し、本来の体積に復する。この再膨潤したゲル中に担持されているペプチド鎖C末端に対して、HFBAと無水酢酸とを前記加熱温度

で作用させることで、ペプチド鎖のC末端アミノ酸の選択的分解反応が進行する。具体的には、ペプチドのC末端において、上述する反応式 (I a) ~ (II') の反応経路を経て、5-オキサゾロン環形成を介する、ペプチド鎖のC末端アミノ酸の逐次的分解反応が進行すると推定される。かかる逐次的分解の各反応過程は、双極性溶媒であるホルムアミド中において、プロトン・ドナーとして機能するH F B Aの触媒作用によって、その反応の促進がなされている。

このC末端アミノ酸の逐次的な分解反応が進行し、ゲル中には、段階的にC末端アミノ酸が除去された、一連の反応産物と、初段の5-オキサゾロン構造への変換時点に留まっている、アセチル基による修飾・保護を施した元のペプチド鎖とが含まれた混合物が、ゲル担体に担持された状態で残される。かかるC末端アミノ酸の逐次的分解処理を終えた後、容器内に残留する、未反応の無水酢酸やH F B A等を含むホルムアミド溶液を除去し、容器中にアセトニトリル 1 mLを注入し、15分間攪拌する。その後、前記アセトニトリルを棄て、新たに、アセトニトリル 1 mLを注入し、更に15分間攪拌する。このアセトニトリルを利用する、ゲル中に含浸するホルムアミド溶液の抽出処理を、合計3回行い、再膨潤ゲル中の脱溶媒（ホルムアミド）処理を行う。脱溶媒処理に伴い、ゲル体積の収縮が生じ、同時に、ゲルの脱水処理もなされる。

（後処理操作）

次いで、反応産物が含まれる混合物が担持されている状態のゲル切片を入れた前記容器内に、DMAE ($(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) 10体積%濃度の水溶液 1 mLを注入する。蜜栓した該容器を攪拌しつつ、容器全体の温度を、60℃に加熱し、かかる温度に、1時間保持する。その際、脱水処理されていたゲルは、溶媒水の浸潤に従って、速やかに再膨潤し、本来の体積に復する。この再膨潤したゲル中に担持されているペプチド鎖、反応産物に対して、塩基性窒素含有有機化合物の存在下、水分子を前記加熱温度で作用させることで、加水処理が進行する。

この後処理における加水処理は、主に、前記混合物中では、反応産物ペプチドのC末端は、カルボキシ基に変換されたもの以外に、5-オキサゾロン構造

に留まったもの、あるいは、非対称型酸無水物への変換まで進行したものも、含まれた混合物状態となっているため、これらに加水処理を施し、ペプチドのC末端は、カルボキシ基となった状態へと変換する処理である。加えて、塩基性窒素含有有機化合物が塩基触媒として機能することに伴い、アセチル基による修飾・保護を施したペプチド鎖上に、セリン残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-\text{CO}-$) やトレオニン残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH})-\text{CO}-$) に存在するヒドロキシ基に対するO-アセチル化保護は加水分解され、脱保護がなされる。また、チロシン残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH})-\text{CO}-$) のフェノール性ヒドロキシ基へのO-アセチル化保護の加水分解も、同様に進む。但し、用いる有機塩基の塩基性は高くないため、N-アセチル化保護の脱保護は進まず、最終的に後処理工程後には、より高い選択性を持って、N末端のアミノ基に対するN-アセチル化、リシン残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)-\text{CO}-$) の ϵ 位のアミノ基へのN-アセチル化が残るものとなる。場合によっては、チロシン残基 ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH})-\text{CO}-$) のフェノール性ヒドロキシ基へのO-アセチル化が、極く僅かに残るものとなる。

かかる後処理工程を終えた後、容器内に残留する水溶液を除去し、容器中にアセトニトリル 1 mL を注入し、15分間攪拌する。その後、前記アセトニトリルを棄て、新たに、アセトニトリル 1 mL を注入し、更に15分間攪拌する。このアセトニトリルを利用する、ゲル中に含浸する水溶液の抽出処理を、合計3回行い、再膨潤ゲル中の脱水処理を行う。脱水処理に伴い、ゲル体積の収縮が生じる。

(トリプシン消化によるペプチド断片化)

ウマ・ミオグロビンのグロビン・ペプチド鎖は、153アミノ酸からなるため、質量分析における、適正な分子量範囲を逸脱しており、トリプシン消化によるペプチド断片化処理を行う。

具体的には、前記の後処理を施し、脱水処理済みのゲル切片を入れた容器内に、トリプシン含有水性溶液を加え、ゲル担体上に担持されている状態のまま、

ペプチド鎖の断片化を行う。前記トリプシン含有水性溶液は、重炭酸アンモニウム緩衝液（pH 8）中に、トリプシンを $0.067 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ の濃度で含有しており、トリプシン消化は、 37°C で、攪拌しつつ、4時間酵素反応を行う。その際、脱水処理されていたゲルは、溶媒水の浸潤に従って、速やかに再膨潤し、本来の体積に復する。この再膨潤したゲル中に担持されているペプチド鎖、反応産物に対して、前記緩衝液とともに、ゲル中に浸入するトリプシンを前記加熱温度で作用させることで、トリプシンに特異的な酵素消化が進行する。

なお、ペプチド鎖、反応産物は、前記後処理工程における脱保護によっても、N末端のアミノ基に対するN-アセチル化、リシン残基（ $-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)-\text{CO}-$ ）の ϵ 位のアミノ基へのN-アセチル化は保持された状態であり、トリプシン消化によっては、前記N-アセチル化リシン残基のC末側ペプチド結合の切断はなされず、アルギニン残基のC末側ペプチド結合切断が進行する。このウマ・ミオグロビンのグロビン・ペプチド鎖が有するアミノ酸配列は既に判明しており、図7に示すようにアルギニン残基のC末側ペプチド結合切断に伴い、153アミノ酸からなる元のペプチド鎖は、1-31、32-139、140-153の各部分アミノ酸配列を含む断片に、トリプシン消化を受ける。なお、図7には、前処理操作に伴い、N-アセチル化保護が施されるリシン残基を網かけ表示で示し、さらには、トリプシン消化による、アルギニン残基のC末側ペプチド結合切断で生じる、N末側の1-31とC末側の140-153の各部分アミノ酸配列を太字で示す。

トリプシン消化によって断片化されると、これらのペプチド断片は、ゲル担体から溶出を生じ易くなり、容器内のトリプシン溶液中に溶出する。なお、かかるトリプシン消化処理工程では、前記140-153アミノ酸の部分アミノ酸配列を含むC末断片とともに、上述するC末端アミノ酸の逐次的分解処理で生成される一連の反応産物に由来するC末断片も、容器内のトリプシン溶液中に溶出する。すなわち、該トリプシン消化処理は、長いアミノ酸長のペプチド鎖から、そのC末部分を、質量分析に適合する所望の分子量範囲のペプチド断

片とするとともに、かかるペプチド断片を、ゲル中から高い収率で溶出、回収することを可能としている。

かかるトリプシン消化処理工程を終えた後、ゲル中から容器内のトリプシン溶液中に溶出する断片化されたペプチドを回収する。回収されたペプチド断片の混合物を含む溶液について、脱塩処理を施した後、真空乾燥処理を行う。

(後処理、トリプシン消化によるペプチド断片化済みの反応産物の特定)

以上の一連の処理を施して得られる、後処理、ペプチド断片化済みの反応産物とグロビン・ペプチド鎖のC末断片との混合物について、質量分析法により、含有される各ペプチド断片の分子量の測定を行う。

本実施例でも、脱塩処理を施し、上記乾燥処理を行ったペプチド断片混合物試料に対して、MALDI-TOF-MS装置を利用し、各ペプチド断片の分子量を反映する主イオン種ピークの質量と、その相対的な信号強度の測定、比較を行う。なお、かかるMALDI-TOF-MS装置を利用する測定では、イオン種の分別は、負帯電イオン種を検出器へ導く、所謂ネガティブ・モードの測定と、正帯電イオン種を検出器へ導く、所謂ポジティブ・モードの測定との双方を行う。すなわち、各ペプチド断片の分子量を反映する主イオン種として、ポジティブ・モードの測定において、プロトン (H^+) が付加された陽イオン種、ネガティブ・モードの測定において、プロトン (H^+) が離脱した陰イオン種の、対応する二種のスペクトルを得る。

この実施例2でも、図5に示すポジティブ・モードの測定と、図6に示すネガティブ・モードの測定とを対比すると、ウマ・ミオグロビンのグロビン・ペプチド鎖に由来するトリプシン消化断片に相当する主な二つのピークとして、1-31の部分アミノ酸配列、ならびに、140-153の部分アミノ酸配列を含む断片が、かかる分子量範囲に見出される。図5に示すポジティブ・モードの測定において、その強度は相対的に大きなピークは、C末端にアルギニン残基を有する1-31の部分アミノ酸配列のN末側ペプチド断片に相当し、一方、図6に示すネガティブ・モードの測定において、その強度は相対的に大きなピークは、アルギニン残基を含まない140-153の部分アミノ酸配列の

C末側ペプチド断片に相当すると判定される。加えて、32-139の部分アミノ酸配列中、N-アセチル基の離脱されたリシン残基における切断で派生する、78-102の部分アミノ酸配列に相当するペプチド断片も見出され、同じく、図5に示すポジティブ・モードの測定において、その強度は相対的に大きなピークを示している。その他、トリプシンの自己消化で生じるペプチド断片も、かかる分子量範囲で見出され、同じく、図5に示すポジティブ・モードの測定において、その強度は相対的に大きなピークを示している。

図6に示すネガティブ・モードの測定では、140-153の部分アミノ酸配列のC末側ペプチド断片に加えて、C末端アミノ酸の逐次的分解処理を施した反応産物に由来する一連のC末側ペプチド断片も、その強度は相対的に大きく測定されている。表2に、測定されたピークの質量値、元のグロビン・ペプチド鎖のC末断片に起因するピークの質量値との差異、ならびに、それから特定される、各反応産物断片において除去されているアミノ酸、および、各反応産物の形態を示す。

表 2

| m/Z | Δm | 帰属 | 対応ペプチド構造 |
|---------|------------|----------|------------------------|
| 1636.55 | — | | NDIAAK(Ac)YK(Ac)ELGFQG |
| 1578.49 | 58.06 | —Gly | NDIAAK(Ac)YK(Ac)ELGFQ |
| 1450.52 | 186.03 | —Gln-Gly | NDIAAK(Ac)YK(Ac)ELGF |

本実施例2の、ゲル中での、双極性非プロトン溶媒を用いた反応試薬溶液を利用する処理法でも、C末端アミノ酸の逐次的分解処理により、C末端から二つのアミノ酸、グリシンとグルタミンが逐次的に分解された反応産物に由来するピークが確認される。すなわち、解析対象である上述のゲル切片上のバンドとして分離されるペプチド鎖は、実際に、グロビン・ペプチド鎖であり、C末端アミノ酸の逐次的分解処理をゲル上に担持した状態で実施できることが、検証される。

本発明の第二の形態にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法を利用することで、解析対象のペプチド鎖をゲル中に担持した状態で、C末端アミノ酸の逐次的分解を進めた際にも、本質的に遜色のない解析確度が達成されていることが確認される。

5 (参考例1)

本発明にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法では、リシン残基側鎖をN-アシル化保護した状態で、ペプチド鎖をトリプシン消化することで、得られるN末側のアミノ酸配列に由来する共通のペプチド断片は、C末端にアルギニン残基を有するペプチド断片となることを利用して、C末端側ペプチド断片との区別利用している。仮に、元々、解析対象試料となるペプチド鎖が、そのC末端にアルギニンを有する場合であっても、MALDI-TOF-MS装置を利用する測定において、各ペプチド断片の分子量を反映する主イオン種として、ポジティブ・モードの測定により、プロトン (H^+) が付加された陽イオン種、ネガティブ・モードの測定により、プロトン (H^+) が離脱された陰イオン種の、対応する二種のスペクトルを取得し、その対比によって、一連の反応産物に由来するC末端側ペプチド断片を特定可能であることを検証した。

本参考例では、ペプチド鎖のN末アミノ基を、N-アセチル化保護を施した、14アミノ酸からなるペプチド、N-アセチル化Glu¹-Fibrinopeptide断片について、そのC末端アミノ酸配列の解析を行った。

20 (C末端アミノ酸分解除去反応の操作)

予め、N-アセチル化処理して得られる前記ペプチド試料 (Ac-EGVNDNEEGFFSAR) の乾燥試料を保持しているバイアルを、共栓付き気密試験管型のガラス製反応容器内に装着した状態で、このガラス製反応容器内に別途、下記する液状試薬を所定量入れる。

25 このC末端アミノ酸の選択的分解反応用の液状試薬として、トリフルオロ酢酸を5体積%添加した無水酢酸 (300 μ L) を用い、前記ガラス製反応容器内に乾燥試料を収納したバイアルを収納した後、冷却下、反応容器内を真空排気し、気密状態に封止する。

この気密状態の反応容器全体を、40℃、16時間保温して、容器内の液状試薬から供給される、蒸気状の無水酢酸とトリフルオロ酢酸を、乾燥試料に作用させる。

5 なお、かかるC末端アミノ酸の選択的分解処理を終えた後、反応容器内に残留する、未反応の無水酢酸やトリフルオロ酢酸等を減圧留去するとともに、残余するN-アセチル化Glu¹-Fibrinoペプチド試料と得られる反応産物との混合物の乾燥を行う。

（後処理操作）

10 次いで、N-アセチル化Glu¹-Fibrinoペプチド断片と得られる反応産物が含まれる混合物の乾燥試料を保持しているバイアルを、同じく共栓付き気密試験管型のガラス製反応容器内に装着した状態で、このガラス製反応容器内に別途、下記する液状試薬を所定量入れる。

15 本参考例1では、加水後処理の液状試薬として、ピリジンを10体積%溶解した水溶液（300μL）を用い、前記ガラス製反応容器内に乾燥試料を収納したバイアルを収納した後、冷却下、反応容器内を真空排気し、気密状態に封止する。

20 この気密状態の反応容器全体を、100℃、30分間加熱して、容器内の液状試薬から供給される、蒸気状のピリジンと水分子を、乾燥試料に作用させる。前記の条件では、セリン残基のO-アセチル化保護の脱保護はなされるものの、N末端のN-アセチル化保護のアミド結合に対する加水分解は起こらないため、得られる後処理済みの反応産物は、ペプチドのN末端にアセチル基が修飾されたN-アセチル化体となる。

25 かかる後処理を終えた後、反応容器内に残留する、残余している水分子やピリジン等を減圧留去するとともに、N-アセチル化Glu¹-Fibrinoペプチド断片と得られる後処理済みの反応産物との混合物の乾燥を行う。

（後処理済みの反応産物の特定）

以上の一連の化学的処理を施して得られる、後処理済みの反応産物と元のペプチド断片との混合物について、MALDI-TOF-MS装置を利用し、各

ペプチド断片の分子量を反映する主イオン種として、ポジティブ・モードの測定において、プロトン (H^+) が付加された陽イオン種、ネガティブ・モードの測定において、プロトン (H^+) が離脱した陰イオン種の、対応する二種のスペクトルを得る。

- 5 図 8 に示す、二種のスペクトルを対比すると、ポジティブ・モードの測定において、1-14 のアミノ酸配列を保持する元のペプチド断片は、その強度は相対的に大きく、アルギニン残基を含むことが確認される。加えて、ネガティブ・モードの測定において、この元のペプチド断片から、アルギニン残基が分解除去された分子量に相当するピークが観測されるものの、一方、ポジティブ・
- 10 モードの測定においては、対応するピークは、明確には見出されない。従って、1-14 のアミノ酸配列を保持する元のペプチド断片は、C末端にアルギニン残基を有しており、ポジティブ・モードの測定において、その強度は相対的に大きいものの、ネガティブ・モードの測定において、付随する一連の反応産物に起因するイオン種が見出され、かつ、アルギニン残基が分解除去された分子量に相当するピークの存在するので、C末端アミノ酸の逐次的な分解除去を受けていることが、確認される。表 3 に、測定されたピークの質量値、元のペプチド鎖に起因するピークの質量値との差異、ならびに、それから特定される、
- 15 各反応産物断片において除去されているアミノ酸、および、各反応産物の形態を示す。

20 表 3

| m/Z | Δm | 帰属 | 対応ペプチド構造 |
|---------|------------|------------------|-------------------|
| 1610.68 | — | 1-14 | Ac-EGVNDNEEGFFSAR |
| 1454.58 | 156.10 | -Arg | Ac-EGVNDNEEGFFSA |
| 1383.54 | 227.14 | -Ala-Arg | Ac-EGVNDNEEGFFS |
| 1296.51 | 314.17 | -Ser-Ala-Arg | Ac-EGVNDNEEGFF |
| 1149.44 | 461.24 | -Phe-Ser-Ala-Arg | Ac-EGVNDNEEGF |

- すなわち、仮に、元のペプチド鎖のアミノ酸配列は、C末端にアルギニンを有する場合であっても、トリプシン消化で得られるC末側ペプチド断片に付随して、アルギニン残基の除去に相当する分子量減少を示すピークの有無を精査することで、C末側ペプチド断片であるか、その他のN末側のアミノ酸配列に由来するペプチド断片であるかを、高い確度で判定することが可能であることが検証される。

産業上の利用の可能性

- 本発明にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法は、ペプチドのC末端アミノ酸を逐次的に分解除去する際、対象とするペプチド鎖に対して、予め、ペプチド鎖のN末端アミノ基、ならびに、リシン残基側鎖のアミノ基に対して、N-アシル化保護を行うことで、同時に、セリン残基 ($\text{—NH—CH(CH}_2\text{OH)—CO—}$) やトレオニン残基 ($\text{—NH—CH(CH(CH}_3\text{)OH)—CO—}$) に存在するヒドロキシ基に対しても、O-アシル化保護がなされた状態で、乾燥雰囲気下、穏和な加熱温度において、アルカン酸無水物に少量のパーフルオロアルカン酸を組み合わせた反応試薬を作用させ、5-オキサゾロン構造を経て、該5-オキサゾロン環の開裂に伴いC末端アミノ酸の分解を行って、一連の反応産物を調製する手法を採用している。かかる手法では、利用するアルカン酸無水物自体、反応性が低いため、ペプチドの途中におけるアミド結合の分断等の不要な副次反応を引き起こすことなく、穏和な加熱条件で、ペプチドのC末端アミノ酸を逐次的に分解除去することが可能となる。付随して、ペプチドの途中におけるアミド結合の分断が無いので、得られる反応産物中に、前記アミド結合の分断により派生するペプチド断片、ならびに、そのペプチド断片を起源とする反応産物が混入することも回避できる。さらには、かかる穏和な条件での反応を利用することで、得られる一連の反応産物に対して、後処理において、有機塩基性化合物の存在下、加水処理を行うことで、C末端にカルボキシ基を有し、O-アシル化保護は脱保護されるものの、ペプチド鎖のN末端アミノ基、ならびに、リシン残基側鎖のアミノ基におけるN-アシル化保護

を保持するものとする。最終的に、トリプシン消化を施し、N-アシル化保護されているリシン残基のC末側での切断を回避しつつ、アルギニン残基のC末側での切断を行って、アミノ酸長の長いペプチド鎖より、MALDI-TOF-MS装置を利用する測定に適する分子量範囲となる、C末端側ペプチド断片を調製した上で、該C末端側ペプチド断片における一連の分子量減少に基づき、C末端アミノ酸の逐次的な分解除去を受けて、短縮されるC末端アミノ酸配列を高い精度で決定できる。

加えて、上述するC末端アミノ酸の逐次的な分解除去の化学的処理においては、そのペプチド鎖のアミノ酸長変化は、多くとも10アミノ酸程度であるので、対象とするペプチドを、予めゲル電気泳動法による分離を行った後、該ゲル担体上に担持された状態を維持したまま、これら化学的処理を進めることもできる。一方、トリプシン消化を施して、ペプチド断片化を行うと、アミノ酸長が格段に短いペプチド断片は、ゲル担体上に最早安定に保持できず、簡便にゲル担体上より溶出させ、回収することが可能となる。従って、このペプチドのC末端アミノ酸を逐次的に分解除去する際の優れた制御性、ならびに、穏和な反応条件、例えば、反応温度の許容される変動幅の広さの利点、さらには、アミノ酸長の長いペプチド鎖に対しても、そのC末端アミノ酸配列解析を高い精度で実施できることから、本発明にかかるペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法は、より汎用性に富む解析方法となる。

請求の範囲

1. 解析対象とするペプチドのC末端アミノ酸配列を解析する方法であって、対象とするペプチドより、化学的手段によりC末端アミノ酸を逐次的に分解して得られる一連の反応生成物を含む混合物を調製する工程と、
5 前記一連の反応生成物と、元となるペプチドとの分子量差を、質量分析法により分析し、かかるC末端アミノ酸の逐次的分解に伴う分子量減少を測定する工程と、

- 測定された一連の分子量減少量に基づき、逐次的分解された一連のアミノ酸を特定し、C末端より配列させて、C末端のアミノ酸配列情報を得る工程とを
10 具え、

前記C末端アミノ酸を逐次的に分解する工程は、

対象とする前記ペプチドの乾燥試料に対して、乾燥雰囲気下、10℃～60℃の範囲に選択される温度において、

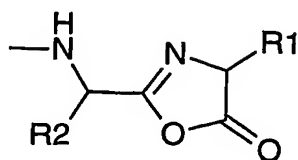
- 15 アルカン酸無水物にアルカン酸を少量添加してなる混合物より供給される、蒸気状のアルカン酸無水物とアルカン酸とを作用させ、

該ペプチドN末端のアミノ基ならびに、該ペプチドに含有されている可能性のあるリシン残基側鎖のアミノ基に対して、前記アルカン酸無水物由来のアシル基によるN-アシル化を施す、N-アシル化保護を施す前処理工程と、

- 20 前記N-アシル化保護済みの、対象とするペプチドの乾燥試料に対して、乾燥雰囲気下、15℃～60℃の範囲に選択される温度において、

アルカン酸無水物にパーフルオロアルカン酸を少量添加してなる混合物より供給される、蒸気状のアルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸とを作用させ、

- 25 ペプチドのC末端において、下記する一般式 (III) :



(III)

(式中、

R 1 は、ペプチドの C 末端アミノ酸の側鎖を表し、

R 2 は、前記 C 末端アミノ酸の直前に位置するアミノ酸残基の側鎖を表す) で
 5 表記される 5-オキサゾロン構造を経て、該 5-オキサゾロン環の開裂に伴い
 C 末端アミノ酸の分解を行う工程と、

前記 C 末端アミノ酸を逐次的に分解する工程で得られる一連の反応生成物を
 含む混合物に対して、

10 残余する前記アルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸とを乾燥状態にお
 いて除去する後処理を施し、

次いで、塩基性含窒素芳香環化合物または第三アミン化合物を溶解する水溶
 液を利用し、蒸気状の塩基性含窒素芳香環化合物または第三アミン化合物と水
 分子を供給して、

15 前記塩基性の窒素含有有機化合物の共存下、前記反応生成物ペプチドに水分
 子を作用させ、

前記の加水処理を施した後、かかる一連の反応生成物を含む混合物に残余す
 る、前記塩基性の窒素含有有機化合物と水分子を除去、乾燥する再乾燥後処理
 を行うことからなる加水処理の工程とを、少なくとも含んでなり、

20 前記 C 末端アミノ酸の逐次的分解に伴う分子量減少を測定する工程では、
 再乾燥後処理後、前記加水処理済みの一連の反応生成物を含む混合物に対し
 て、

25 緩衝溶液中において、トリプシンを作用させ、該ペプチド鎖の N 末端のアミ
 ノ基ならびに、該ペプチド鎖に含有されている可能性のあるリシン残基側鎖の
 アミノ基に対する上記 N-アシル化保護が保持されている、該ペプチド鎖のト
 リプシン酵素特異的な消化処理を施して、該ペプチド鎖中に存在するアルギニ
 ン残基の C 末側ペプチド結合の選択的な切断によるペプチド断片化を行い、

脱塩処理を施し、前記緩衝溶液成分を除去して、該トリプシン消化処理済みペプチド断片を回収し、乾燥する工程を設け、

次いで、前記回収された該トリプシン消化処理済みペプチド断片を含む乾燥混合物について、MALDI-TOF-MS法を利用し、該イオン化処理で生
5 じる陽イオン種による分子量測定、ならびに陰イオン種による分子量測定を行い、

前記陽イオン種による分子量測定、ならびに陰イオン種による分子量測定において測定される、対応するイオン種において、

前記トリプシン消化処理で生成するC末端にアルギニン残基を有するペプチ
10 ド断片のピークは、

陽イオン種による分子量測定における強度は、陰イオン種による分子量測定における強度と比較して、相対的に大きな強度を与えるピークと判定し、

前記トリプシン消化処理で生成する、元となるペプチドに由来するC末端のペプチド断片ならびに、C末端アミノ酸を逐次的に分解して得られる一連の反
15 応生成物に由来するC末端のペプチド断片のピークは、

陰イオン種による分子量測定における強度は、陽イオン種による分子量測定における強度と比較して、相対的に大きな強度を与えるピークと判定し、

該陰イオン種による分子量測定において、相対的に大きな強度を与える一連のピークに基づき、C末端アミノ酸の逐次的分解に伴う分子量減少を測定する
20 手法を採用することを特徴とするペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法。

2. 前記アルカン酸無水物にパーフルオロアルカン酸を少量添加してなる混合物に含まれるアルカン酸無水物として、炭素数2～4のアルカン酸の対称型酸無水物を用いることを特徴とする、請求の範囲 第1項に記載の方法。

3. 前記炭素数2～4のアルカン酸の対称型酸無水物として、炭素数2～4
25 の直鎖アルカン酸の対称型酸無水物を用いることを特徴とする、請求の範囲 第2項に記載の方法。

4. 前記アルカン酸無水物にパーフルオロアルカン酸を少量添加してなる混合物に含まれるアルカン酸無水物として、無水酢酸を用いることを特徴とする、

請求の範囲 第1項に記載の方法。

5. 前記アルカン酸無水物にパーフルオロアルカン酸を少量添加してなる混合物に含まれるパーフルオロアルカン酸として、当該パーフルオロアルカン酸の示す pK_a は、0.3～2.5の範囲であるパーフルオロアルカン酸を用いることを特徴とする、請求の範囲 第1項に記載の方法。

6. 前記アルカン酸無水物にパーフルオロアルカン酸を少量添加してなる混合物に含まれるパーフルオロアルカン酸として、炭素数2～4のパーフルオロアルカン酸を用いることを特徴とする、請求の範囲 第1項に記載の方法。

7. 前記炭素数2～4のパーフルオロアルカン酸として、炭素数2～4の直鎖パーフルオロアルカン酸を用いることを特徴とする、請求の範囲 第6項に記載の方法。

8. 前記アルカン酸無水物にパーフルオロアルカン酸を少量添加してなる混合物中における、パーフルオロアルカン酸の含有比率は、アルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸との合計体積に対して、1～20体積%の範囲に選択することを特徴とする、請求の範囲 第1項に記載の方法。

9. 前記アルカン酸無水物にパーフルオロアルカン酸を少量添加してなる混合物を利用する処理に際して、

前記乾燥雰囲気は、水分に加えて、酸素も除去された状態であることを特徴とする、請求の範囲 第1項に記載の方法。

10. 前記乾燥雰囲気は、気密容器内において、その内部の大気を真空排気することで、達成されていることを特徴とする、請求の範囲 第9項に記載の方法。

11. 前記アルカン酸無水物にパーフルオロアルカン酸を少量添加してなる混合物を利用する処理に際して、その温度は、15℃～50℃の範囲に選択される温度とすることを特徴とする、請求の範囲 第1項に記載の方法。

12. 解析対象とするペプチドのC末端アミノ酸配列を解析する方法であって、

対象とするペプチドより、化学的手段によりC末端アミノ酸を逐次的に分解

して得られる一連の反応生成物を含む混合物を調製する工程と、

前記一連の反応生成物と、元となるペプチドとの分子量差を、質量分析法により分析し、かかるC末端アミノ酸の逐次的分解に伴う分子量減少を測定する工程と、

- 5 測定された一連の分子量減少量に基づき、逐次的分解された一連のアミノ酸を特定し、C末端より配列させて、C末端のアミノ酸配列情報を得る工程とを具え、

前記C末端アミノ酸を逐次的に分解する工程は、

- 10 予めゲル電気泳動法による分離がなされ、該ゲル担体上に担持された状態の対象とするペプチド試料に対して、

前記ゲル担体中に含浸される水溶媒を、該ゲル状物質の溶解を引き起こさず、かつ、水に対して親和性を有する極性非プロトン性溶媒を用いて、希釈除去することにより、該ゲル担体の脱水処理を行う工程と、

- 15 前記脱水処理を施した後、該ゲル担体上に担持された状態の対象とするペプチド試料に対して、30℃～80℃の範囲に選択される温度において、

- 該ゲル状物質内に浸潤でき、膨潤状態に維持可能である、双極性非プロトン性溶媒中に、アルカン酸無水物を溶解してなる溶液を用いて、該アルカン酸無水物溶液中に該ゲル担体を浸漬することにより、担持された状態の対象とするペプチド試料にアルカン酸無水物を作用させ、対象とするペプチドのN末端のアミノ基ならびに、該ペプチド中に含有される可能性のあるリシン残基側鎖上のアミノ基に、予め、前記アルカン酸無水物を構成するアルカン酸に由来するアシル基によるN-アシル化保護を施し、

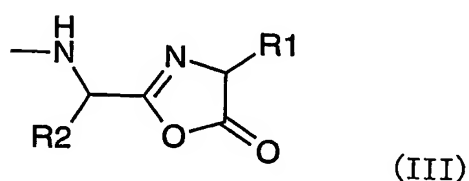
- 20 次いで、該ゲル状物質の溶解を引き起こさず、かつ、前記アルカン酸無水物、ならびに双極性非プロトン性溶媒に対して親和性を有する極性非プロトン性溶媒を用いて、希釈除去することにより、N-アシル化反応の停止と反応試薬の除去を行う前処理工程と、

前記N-アシル化保護の前処理を施した後、該ゲル担体上に担持された状態の対象とするペプチド試料に対して、30℃～80℃の範囲に選択される温度

において、

該ゲル状物質内に浸潤でき、膨潤状態に維持可能である、双極性非プロトン性溶媒中に、パーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる比率で溶解してなる混合溶液を用いて、該混合溶液中に該ゲル担体を浸漬することにより、担持された状態の対象とするペプチド試料にアルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸とを作用させ、

ペプチドのC末端において、下記する一般式 (III) :



(式中、

R 1 は、ペプチドのC末端アミノ酸の側鎖を表し、

R 2 は、前記C末端アミノ酸の直前に位置するアミノ酸残基の側鎖を表す) で表記される5-オキサゾロン構造を経て、該5-オキサゾロン環の開裂に伴いC末端アミノ酸の逐次的分解を行い、

前記C末端アミノ酸の逐次的分解反応に利用した混合溶液を、該ゲル状物質の溶解を引き起こさず、かつ、前記パーフルオロアルカン酸とアルカン酸無水物、ならびに双極性非プロトン性溶媒に対して親和性を有する極性非プロトン性溶媒を用いて、希釈除去することにより、分解反応の停止と反応試薬の除去を行う工程と、

さらに、前記C末端アミノ酸を逐次的に分解する反応で得られる一連の反応生成物を含む混合物に対して、該ゲル担体上に担持された状態のまま、塩基性含窒素芳香環化合物または第三アミン化合物を溶解する水溶液を利用し、該水溶液中にゲル担体を浸漬することにより、前記塩基性の窒素含有有機化合物の共存下、前記反応生成物ペプチドに水分子を作用させ、加水処理を施し、

次いで、前記ゲル担体中に含浸される水溶液を、該ゲル状物質の溶解を引き起こさず、かつ、水に対して親和性を有する極性非プロトン性溶媒を用いて、

希釈除去することにより、該ゲル担体の再脱水処理を施すことからなる、付加的な加水処理と再脱水処理の工程とを有し、

前記C末端アミノ酸の逐次的分解に伴う分子量減少を測定する工程では、

再脱水処理後、前記加水処理済みの一連の反応生成物を含む混合物に対して、

- 5 該ゲル担体上に担持された状態で、緩衝溶液中に溶解するトリプシンを作用させ、該ペプチド鎖のN末端のアミノ基ならびに、該ペプチド鎖に含有されている可能性のあるリシン残基側鎖のアミノ基に対する上記N-アシル化保護が保持されている、該ペプチド鎖のトリプシン酵素特異的な消化処理を施して、該ペプチド鎖中に存在するアルギニン残基のC末側ペプチド結合の選択的な切断によるペプチド断片化を行って、

かかるゲル担体上から該ペプチド断片の遊離と、前記緩衝溶液中への溶出を行い、その後、脱塩処理を施し、前記緩衝溶液成分を除去して、該トリプシン消化処理済みペプチド断片を回収し、乾燥する工程を設け、

- 15 次いで、前記回収された該トリプシン消化処理済みペプチド断片を含む乾燥混合物について、MALDI-TOF-MS法を利用し、該イオン化処理で生じる陽イオン種による分子量測定、ならびに陰イオン種による分子量測定を行い、

前記陽イオン種による分子量測定、ならびに陰イオン種による分子量測定において測定される、対応するイオン種において、

- 20 前記トリプシン消化処理で生成するC末端にアルギニン残基を有するペプチド断片のピークは、

陽イオン種による分子量測定における強度は、陰イオン種による分子量測定における強度と比較して、相対的に大きな強度を与えるピークと判定し、

- 25 前記トリプシン消化処理で生成する、元となるペプチドに由来するC末端のペプチド断片ならびに、C末端アミノ酸を逐次的に分解して得られる一連の反応生成物に由来するC末端のペプチド断片のピークは、

陰イオン種による分子量測定における強度は、陽イオン種による分子量測定における強度と比較して、相対的に大きな強度を与えるピークと判定し、

該陰イオン種による分子量測定において、相対的に大きな強度を与える一連のピークに基づき、C末端アミノ酸の逐次的分解に伴う分子量減少を測定する手法を採用することを特徴とするペプチドのC末端アミノ酸配列解析方法。

1 3. 前記パーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる
5 比率で溶解してなる混合溶液に含まれるアルカン酸無水物として、炭素数2～4のアルカン酸の対称型酸無水物を用いることを特徴とする、請求の範囲 第12項に記載の方法。

1 4. 前記炭素数2～4のアルカン酸の対称型酸無水物として、炭素数2～4の直鎖アルカン酸の対称型酸無水物を用いることを特徴とする、請求の範囲
10 第13項に記載の方法。

1 5. 前記パーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる比率で溶解してなる混合溶液に含まれるアルカン酸無水物として、無水酢酸を用いることを特徴とする、請求の範囲 第12項に記載の方法。

1 6. 前記パーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる
15 比率で溶解してなる混合溶液に含まれるパーフルオロアルカン酸として、当該パーフルオロアルカン酸の示す pK_a は、0.3～2.5の範囲であるパーフルオロアルカン酸を用いることを特徴とする、請求の範囲 第12項に記載の方法。

1 7. 前記パーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる
20 比率で溶解してなる混合溶液に含まれるパーフルオロアルカン酸として、炭素数2～4のパーフルオロアルカン酸を用いることを特徴とする、請求の範囲 第12項に記載の方法。

1 8. 前記炭素数2～4のパーフルオロアルカン酸として、炭素数2～4の直鎖パーフルオロアルカン酸を用いることを特徴とする、請求の範囲 第17
25 項に記載の方法。

1 9. 前記パーフルオロアルカン酸をアルカン酸無水物に対して少量となる比率で溶解してなる混合溶液中における、アルカン酸無水物とパーフルオロアルカン酸との含有比率は、アルカン酸無水物100容当たり、パーフルオロア

ルカン酸 1 ～ 20 容の範囲に選択することを特徴とする、請求の範囲 第 12 項に記載の方法。

Fig. 1

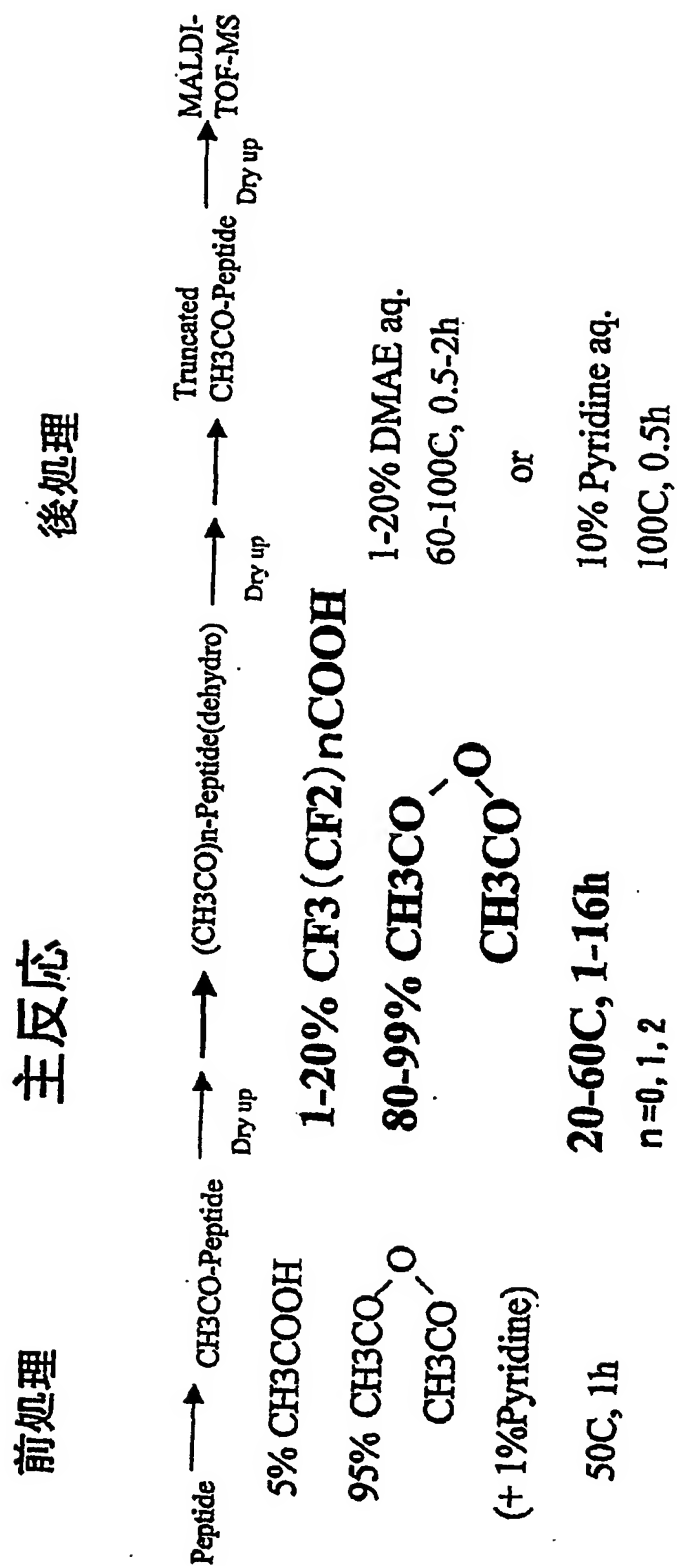


Fig. 2

In Gel での Truncation

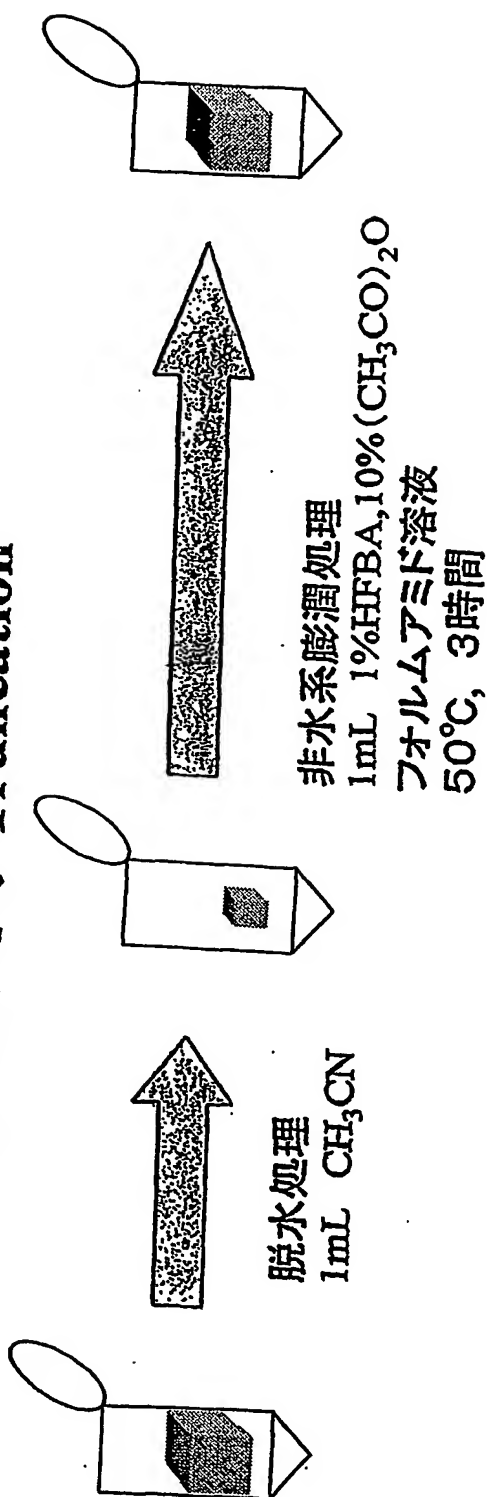


Fig. 3

MALDI-TOF MS on positive mode

Mb, 3h in test tube

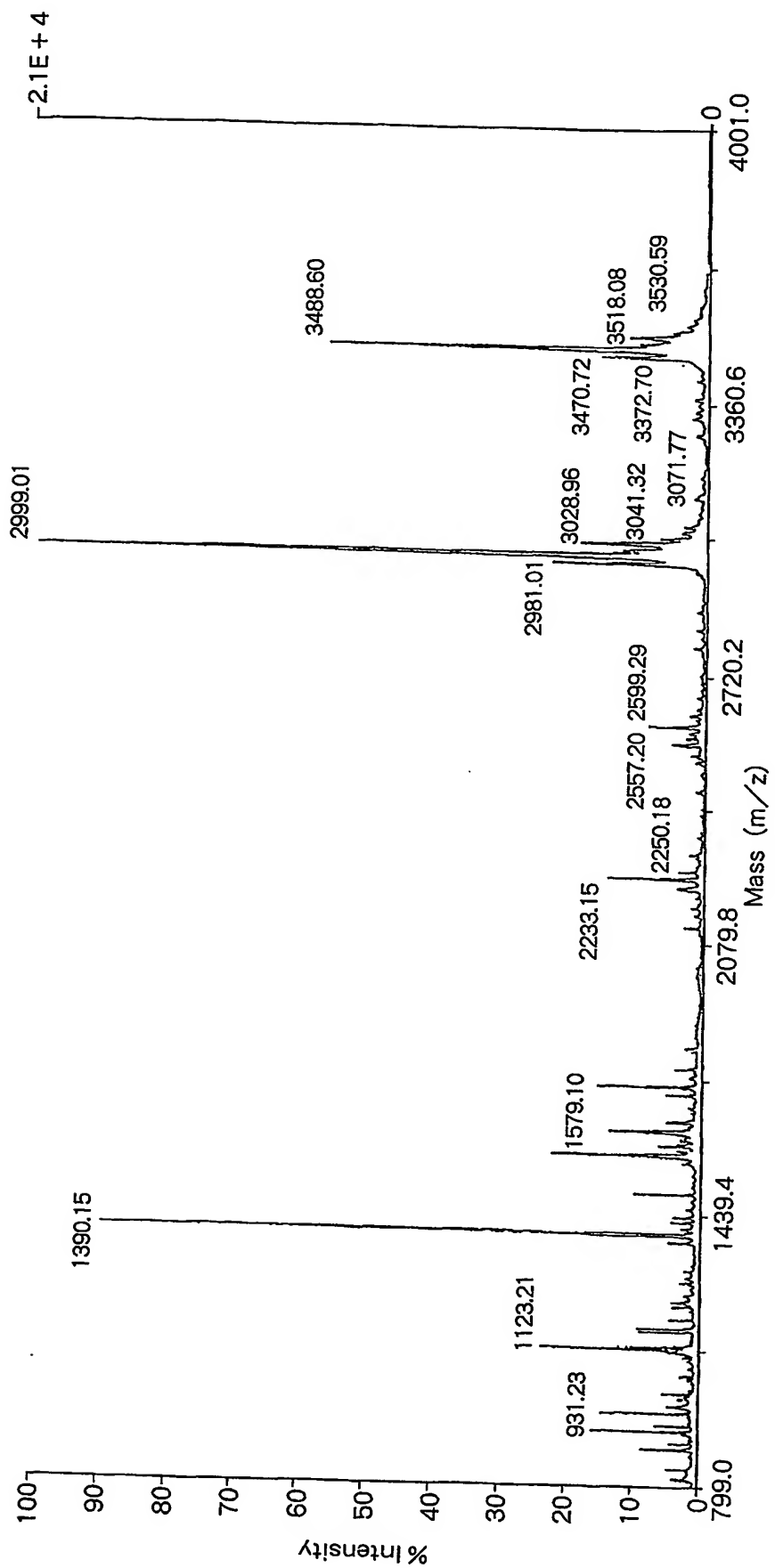


Fig. 4

MALDI-TOF MS on negative mode

Mb, 3h in test tube

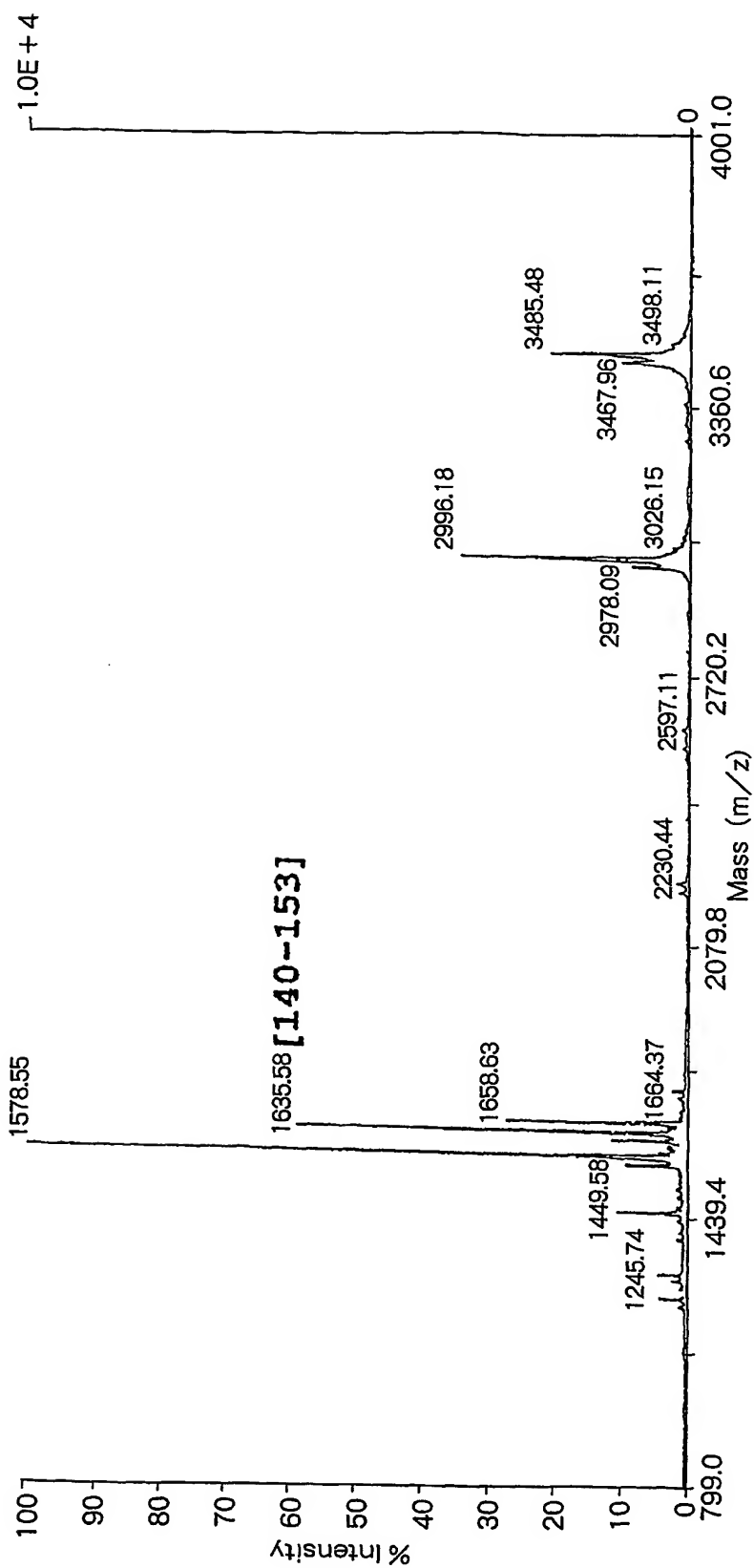


Fig. 5

Mb trncation in gel on positive mode

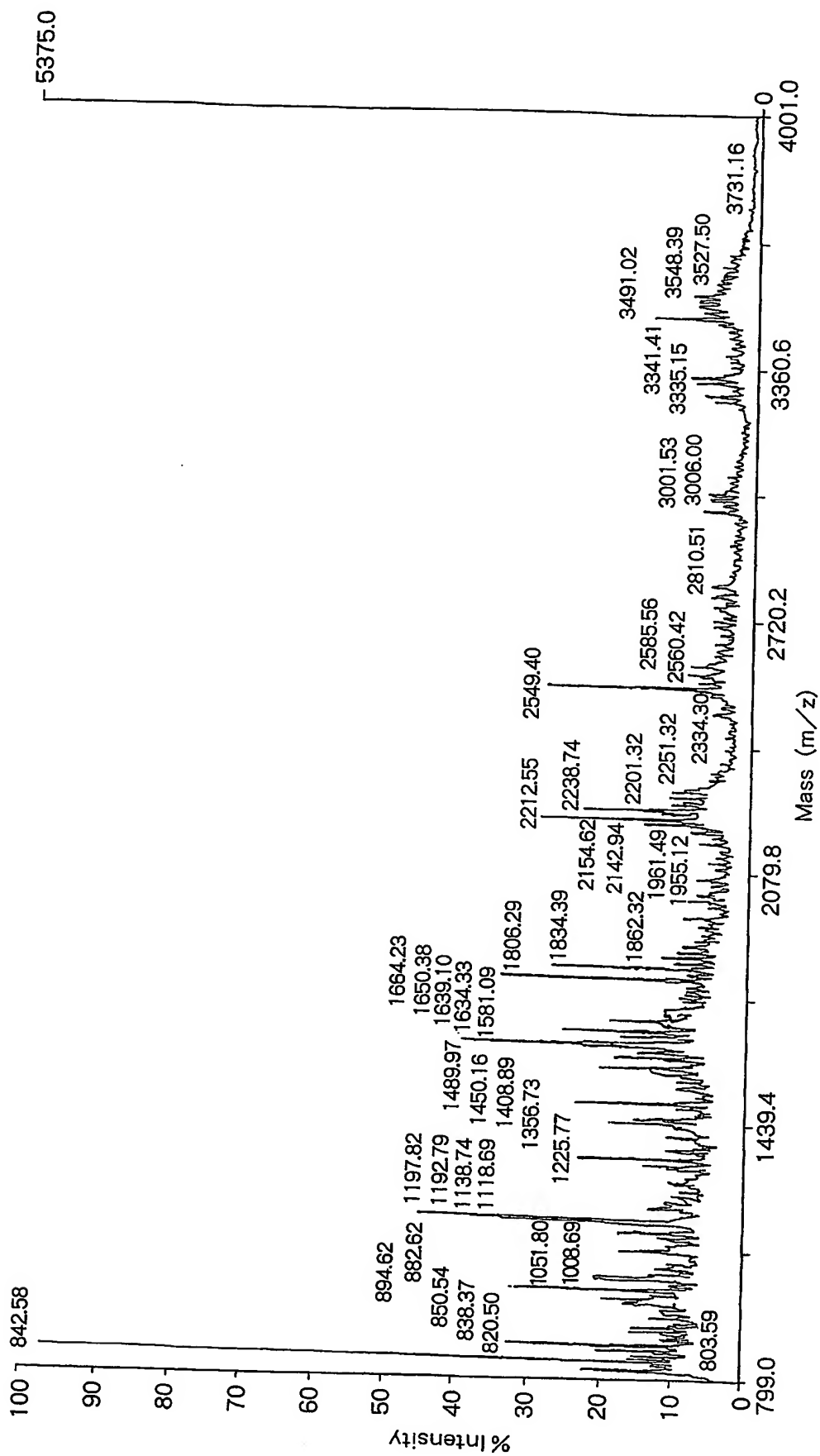


Fig. 6

Mb trncation in gel on negative mode

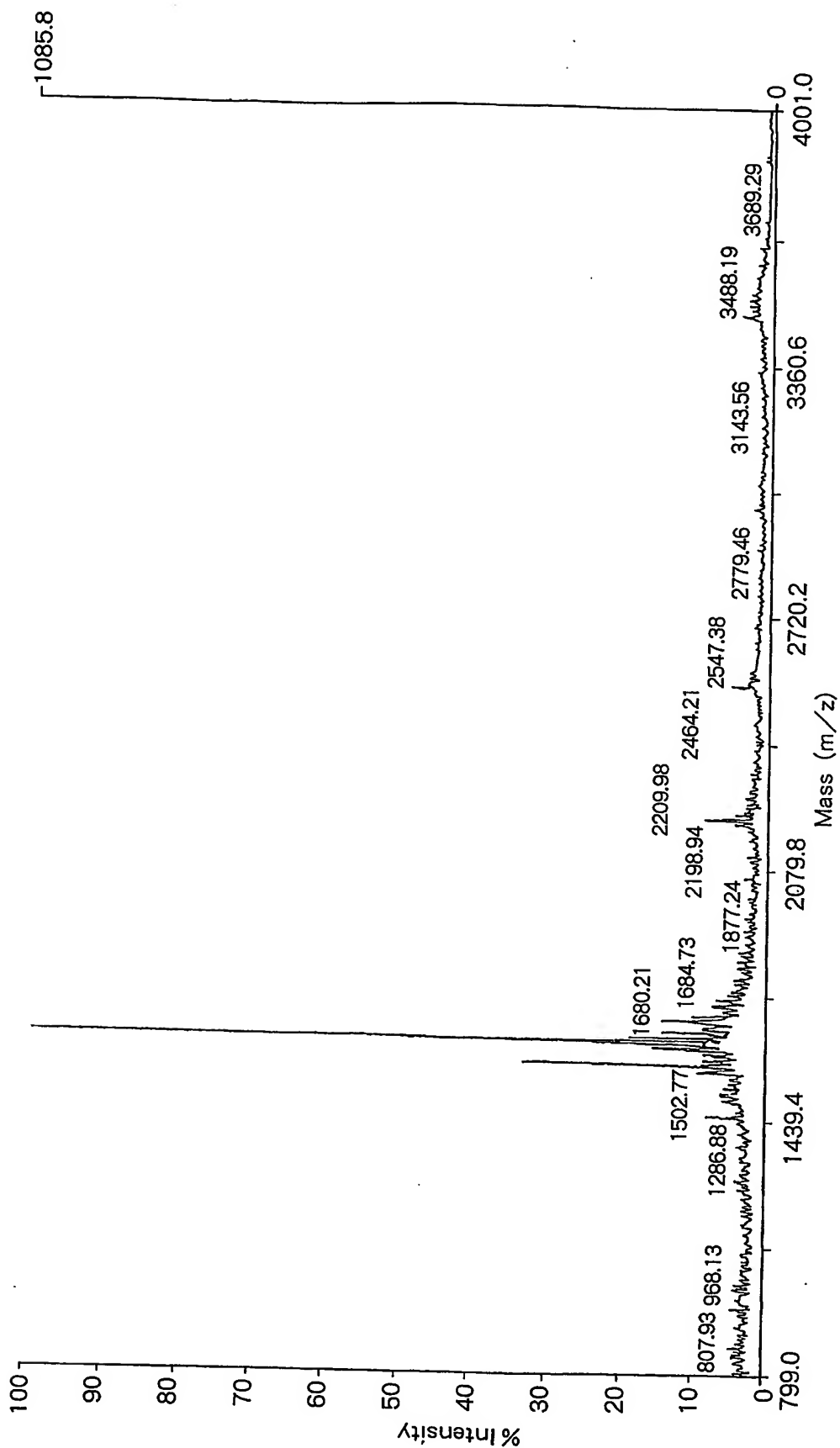


Fig. 7

myoglobin – horse

[1 – 153] mass = 17738.180

Cleavage at R

Small polar : D(7) E(13) N(3) Q(6)
 Large polar : K(19) R(2) H(11)
 Small non-polar : S(5) T(7) A(15) G(15)
 Large non-polar : L(17) I(9) V(7) M(2) F(7) Y(2) W(2)
 Special : C(0) P(4)

K[16] + 42.04 K[42] + 42.04 K[45] + 42.04 K[47] + 42.04
 K[50] + 42.04 K[56] + 42.04 K[62] + 42.04 K[63] + 42.04
 K[77] + 42.04 K[78] + 42.04 K[79] + 42.04 K[87] + 42.04
 K[96] + 42.04 K[98] + 42.04 K[102] + 42.04 K[118] + 42.04
 K[133] + 42.04 K[145] + 42.04 K[147] + 42.04

1 GLSDGEWQQVNLNVWGVEAD I AGHGQEVLI 30
 31 R l f t g h p e t l e f d f h l t e a e m a s e d 60
 61 l h g t v v l t a l g g i l g h h e a e l p l a 90
 91 q s h a t h i p i y l e f i s d a i i h v l h s h p 120
 121 g n f g a d a q g a m t a l e l f r N D I A A Y E L G 150
 151 F Q G 153

(1) [1-31] = 3444.742 (2) [32-139] = 12692.649 (3) [140-153] = 1636.809

Fig. 8

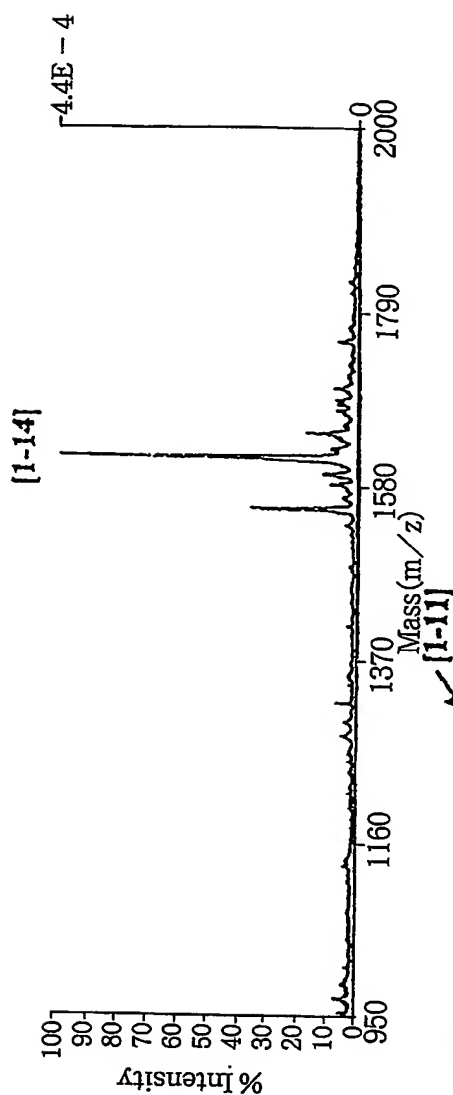
C-terminal Truncation Reaction

Sample: N-acetyl-Glu¹-Fibrino peptide

Ac-EGVNDNEEGFFSAR



Positive mode



Negative mode

